



TESIS DOCTORAL

# Generación de ratones transgénicos que reproducen la falta de procesamiento de Neurexinas por Presenilinas como modelos de la enfermedad de Alzheimer

Ana Carmen Sánchez Hidalgo

Director de Tesis: Dr. Francisco Gómez Scholl

Departamento de Fisiología Médica y Biofísica

Universidad de Sevilla

Sevilla, 2018

Memoria presentada por Ana Carmen Sánchez Hidalgo para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

El presente trabajo de investigación ha sido realizado en el Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), bajo la dirección del Doctor Francisco Gómez Scholl.

El proyecto de investigación ha recibido financiación de la Junta de Andalucía (P11-CVI-7599) y del Ministerio de Economía y Competitividad (BFU2015-71464-R).



DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA MÉDICA Y BIOFÍSICA  
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Dr. Francisco Gómez Scholl, Profesor Titular de Universidad, adscrito al Departamento de Fisiología Médica y Biofísica de la Universidad de Sevilla

CERTIFICA:

Que Doña Ana Carmen Sánchez Hidalgo ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “Generación de ratones transgénicos que reproducen la falta de procesamiento de Neurexinas por Presenilinas como modelo de la Enfermedad de Alzheimer” que presenta para optar al grado de doctor por la Universidad de Sevilla.

Fdo.: Francisco Gómez Scholl

Sevilla, 2018

## RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (AD) es una enfermedad neurodegenerativa asociada con el envejecimiento que se caracteriza por el deterioro progresivo de la memoria en los pacientes. El factor causal mayoritario responsable de casos de AD familiar (FAD) son mutaciones de pérdida parcial de función en los genes de *Presenilina 1 (PS1)* y *Presenilina 2 (PS2)*. Las mutaciones en genes de *PS1/2* asociadas a FAD tienen una herencia autosómica dominante y las personas portadoras presentan un inicio precoz de la enfermedad. Las PS forman la subunidad catalítica del complejo  $\gamma$ -secretasa e intervienen en el procesamiento proteolítico de multitud de sustratos. Sin embargo, se desconocen los sustratos concretos de PS con efecto patogénico en AD.

En los últimos años, nuestro grupo de investigación ha obtenido datos que apuntan a que el procesamiento impedido de Neurexinas (Nrxs) por PS podría mediar déficits asociados a AD. Las Nrxs son proteínas de membrana presináptica que regulan la función y el mantenimiento de las sinapsis mediante la adhesión con ligandos postsinápticos, como Neuroliginas (Nlgn). La inhibición farmacológica o genética de la actividad de PS/ $\gamma$ -secretasa da lugar al acúmulo del fragmento C-terminal de Nrxs (NrxCtf) *in vitro* e *in vivo*. Mutaciones en *PS1* asociadas con FAD impiden el procesamiento normal de Nrxs, resultando en el acúmulo de NrxCtf. *In vivo*, NrxCtf se acumula en los terminales presinápticos de ratones PS cDKO deficientes en los genes *PS1/2* en neuronas principales del prosencéfalo, coincidiendo con la aparición de defectos en la transmisión sináptica y de establecimiento de LTP. Además, el acúmulo selectivo de NrxCtf reproduce los defectos en la liberación de neurotransmisor ocasionados por una falta de función de PS en cultivos de neuronas. Con la finalidad de estudiar *in vivo* el efecto causado por una falta de procesamiento de Nrxs sin afectar la actividad general de PS hacia el resto de sustratos, en esta Tesis Doctoral se han generado modelos de ratón transgénico que expresan de forma constitutiva o inducible NrxCtf exógena en neuronas principales del prosencéfalo. La caracterización de estos modelos de ratón se ha realizado mediante aproximaciones bioquímicas, celulares y de comportamiento, entre otras. Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral apuntan



a un efecto deletéreo del acúmulo de Nrx-CTF *in vivo* y a la aparición de defectos de comportamiento. La posibilidad de poder controlar temporalmente el encendido y apagado de Nrx-CTF ofrece la oportunidad de estudiar los mecanismos responsables de la aparición de los síntomas y su posible reversión.

# ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1. Enfermedad de Alzheimer	2
1.1. Antecedentes históricos de la enfermedad de Alzheimer	2
1.2. Marcadores patológicos de la enfermedad de Alzheimer	3
1.3. Tipos de enfermedad de Alzheimer	3
1.4. Proteína precursora del péptido $\beta$ -amiloide	4
2. Presenilinas	6
2.1. Mutaciones en Presenilinas en la enfermedad de Alzheimer	7
2.2. Presenilinas causan enfermedad de Alzheimer familiar por un mecanismo de pérdida de función	7
2.3. Funciones biológicas de Presenilinas	9
2.3.1. Funciones de Presenilinas independientes de actividad $\gamma$ -secretasa	10
2.3.2. Funciones de Presenilinas dependientes de actividad $\gamma$ -secretasa	11
2.4. Diferentes sustratos de Presenilinas	12
3. Neurexinas	15
3.1. Neuroliguinas como ligandos postsinápticos de Neurexinas	17
3.2. Antecedentes I: Neurexinas como sustrato de presenilinas	20
3.3. Antecedentes II: Neurexinas median los defectos sinápticos originados por la falta de función de Presenilinas	24
4. Hipótesis de Neurexinas-Neuroliguina-1 en la enfermedad de Alzheimer	31
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
<b>III. MATERIALES</b>	<b>35</b>
1. Cultivo de células	36
1.1. Células N2a	36
1.1.1. Mantenimiento de la línea celular N2a	36
1.1.2. Transfección de células N2a	36
1.2. Cultivo primario de neuronas de hipocampo de rata	37
1.2.1. Transfección de cultivos primarios	37
2. Generación de vectores de expresión de HA-NrxCTF	38
2.1. Generación del transgén CaMKII-HA-NrxCTF	38
2.2. Generación del transgén TRE-HA-NrxCTF	38

2.3. Microinyección pronuclear.....	39
3. Aspectos generales del trabajo con un modelo animal .....	39
3.1. Normativa del uso de animales de experimentación.....	39
3.2. Población experimental del modelo animal CaMKII-HA-NrxCTF .....	40
3.3. Población experimental del modelo animal TRE-HA-NrxCTF; CaMKII-tTA ..	40
3.4. Extracción de DNA y genotipado de ratones.....	40
4. Técnicas bioquímicas para el análisis de proteínas.....	41
4.1. Análisis de proteínas mediante <i>Western blot</i> .....	41
4.1.1. Obtención de lisados a partir de tejido .....	41
4.1.2. Obtención de lisados a partir de cultivos celulares .....	42
4.1.3. Electroforesis de geles SDS-poliacrilamida y transferencia de proteínas .....	42
4.1.4. Inmunodetección de proteínas en la membrana .....	43
4.1.5. Revelado, toma de imágenes y cuantificación .....	43
4.2. Fraccionamiento subcelular de sinaptosomas .....	44
5. Técnicas para el análisis histológico .....	45
5.1. Perfusión transcardíaca y seccionado del tejido .....	45
5.2. Inmunohistoquímica.....	46
5.3. Fluorescencia de tejido.....	46
5.4. Tinción de Nissl .....	47
5.5. Toma de imágenes y cuantificación .....	47
6. Inmunofluorescencia de células de cultivo .....	47
7. Experimentos de comportamiento en líneas de ratón .....	48
7.1. Cohorte de animales.....	48
7.2. Análisis SHIRPA .....	49
7.3. Evaluación de la locomoción exploratoria .....	49
7.3.1. Test de campo abierto .....	49
7.3.2. Laberinto elevado en cruz.....	50
7.4. Evaluación del aprendizaje motor: <i>Rotarod</i> .....	51
7.5. Test de acicalamiento o <i>self-grooming</i> .....	51
7.6. Evaluación la memoria .....	52
7.6.1. Reconocimiento de un nuevo objeto .....	52
7.6.2. Evitación pasiva.....	53
7.6.3. Evitación activa .....	54

7.6.4. Condicionamiento al miedo.....	54
8. Anticuerpos utilizados .....	56
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>58</b>
1. Modelos transgénicos de sobreexpresión del fragmento C-terminal de Neurexinas .....	59
1.1. Caracterización <i>in vitro</i> de vectores de expresión de HA-NrxCTF .....	59
1.2. Generación de ratones transgénicos de sobreexpresión constitutiva o inducible de la proteína HA-NrxCTF .....	62
1.3. Caracterización de la expresión de HA-NrxCTF <i>in vivo</i> en el modelo constitutivo CaMKII-HA-NrxCTF .....	63
1.4. Caracterización de la expresión de HA-NrxCTF <i>in vivo</i> en el modelo de ratón transgénico inducible NrxCTF .....	66
1.4.1. Expresión de la proteína HA-NrxCTF <i>in vivo</i> en las líneas NrxCTF.B y NrxCTF.C .....	67
1.4.2. Control temporal de la expresión de HA-NrxCTF con doxiciclina en el ratón NrxCTF.B .....	71
1.4.3. Expresión sináptica de la proteína HA-NrxCTF en la línea NrxCTF.B.....	72
1.4.4. Análisis de los niveles de expresión de proteínas relacionadas con PS en la línea NrxCTF.B .....	73
1.4.5. Análisis de los niveles de acúmulo de HA-NrxCTF de la línea NrxCTF.B en comparación con el modelo APP <sub>sw</sub> /PS1 <sup>ΔE9</sup> .....	76
2. Caracterización general de las líneas NrxCTF.B y NrxCTF.C del modelo inducible de ratón transgénico .....	78
2.1. Frecuencia genotípica en las líneas NrxCTF.B y NrxCTF.C .....	78
2.2. Índice de mortalidad de la línea NrxCTF.B .....	79
2.3. Curva de crecimiento de la línea NrxCTF.B .....	83
3. Caracterización conductual del ratón NrxCTF.B .....	85
3.1. Análisis fenotípico de una población de la línea NrxCTF.B con inicio de expresión temprana.....	87
3.1.1. Cohorte de ratones para comportamiento .....	87
3.1.2. Evaluación general del estado del animal .....	87
3.1.3. Análisis de locomoción exploratoria .....	88
3.1.3.1. Test de campo abierto .....	88
3.1.3.2. Laberinto elevado en cruz .....	90
3.1.4. Análisis de aprendizaje motor: <i>Rotarod</i> .....	93
3.1.5. Análisis de patrones repetitivos de comportamiento: test de acicalamiento .....	95

3.1.6. Evaluación de la memoria .....	95
3.1.6.1. Memoria de reconocimiento de un nuevo objeto.....	96
3.1.6.2. Evitación pasiva .....	98
3.1.6.3. Evitación activa .....	101
3.1.6.4. Condicionamiento al miedo .....	102
3.1.7. Análisis del comportamiento en la línea NrxCtf.B con expresión temprana de HA-NrxCtf tras el tratamiento con Dox .....	104
3.1.8. Resumen del comportamiento de la línea NrxCtf.B de expresión temprana de HA-NrxCtf.....	106
3.2. Caracterización fenotípica del comportamiento en la línea NrxCtf.B con expresión adulta de HA-NrxCtf .....	108
3.2.1. Cohorte de animales para comportamiento .....	108
3.2.2. Evaluación general del estado del animal .....	110
3.2.3. Análisis de locomoción exploratoria .....	110
3.2.3.1. Test de campo abierto .....	110
3.2.3.2. Laberinto elevado en cruz .....	111
3.2.4. Análisis de aprendizaje motor: <i>Rotarod</i> .....	113
3.2.5. Análisis de patrones repetitivos de comportamiento: test de acicalamiento.....	115
3.2.6. Evaluación de la memoria .....	116
3.2.6.1. Memoria de reconocimiento de un nuevo objeto.....	116
3.2.7. Resumen de los ensayos de comportamiento de la línea NrxCtf.B con expresión adulta .....	117
4. Caracterización conductual del ratón NrxCtf.C .....	119
4.1. Cohorte de animales para comportamiento .....	119
4.2. Evaluación general del estado del animal .....	119
4.3. Análisis de locomoción exploratoria: test de campo abierto .....	119
5. Posibles mecanismos afectados en el modelo transgénico de ratón NrxCtf.B...	121
5.1. Análisis de neurodegeneración y pérdida neuronal .....	121
5.1.1. Neurodegeneración.....	121
5.1.2. Pérdida de neuronas .....	124
5.2. Análisis de los niveles de proteínas sinápticas candidatas.....	125
5.2.1. Corteza.....	125
5.2.2. Hipocampo.....	126
5.2.3. Estriado .....	127
<b>V. DISCUSIÓN .....</b>	<b>131</b>

1. Generación de modelos de ratón transgénico para reproducir la falta de procesamiento de Neurexinas por Presenilinas .....	132
2. Posible efecto deletéreo en el modelo de ratón NrxCtf debido al acúmulo de HA-NrxCtf a edades tempranas .....	137
3. Evaluación fenotípica de los ratones NrxCtf.B y su asociación con AD .....	138
4. Posibles mecanismos afectados por el acúmulo de NrxCtf .....	141
<b>VI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>145</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>148</b>
<b>VIII. ANEXOS .....</b>	<b>162</b>
1. Segregación por genotipos en experimentos con resultados relevantes obtenidos en la línea NrxCtf.B.....	163
1.1. Análisis conductual .....	163
1.2. Neurodegeneración .....	165
<b>Listado de abreviaturas.....</b>	<b>167</b>

# I. INTRODUCCIÓN

# 1. Enfermedad de Alzheimer

La demencia es el término general para referirse a una deficiencia en las habilidades cognitivas de magnitud suficiente para interferir con las actividades de la vida cotidiana. La enfermedad de Alzheimer (AD, por sus siglas en inglés) es la forma de demencia más común, representando al menos dos terceras partes de los casos de demencia en personas mayores de 65 años (Qiu et al., 2009). AD es una enfermedad neurodegenerativa que causa un daño progresivo en las funciones cognitivas incluyendo memoria, comprensión, lenguaje, atención, razonamiento y juicio. El síntoma más común de la enfermedad es la pérdida de memoria a corto plazo (Kumar y Tsao, 2018). La prevalencia global de esta enfermedad es de 24 millones de personas afectadas y su predicción es que haya aumentado hasta 4 veces en 2050 (Qiu et al., 2009). La incidencia de la enfermedad es ligeramente mayor en mujeres, especialmente después de los 85 años de edad. El inicio de la enfermedad anterior a los 65 años, se considera inicio temprano de la misma.

## 1.1. Antecedentes históricos de la enfermedad de Alzheimer

AD fue descrita por primera vez por el psiquiatra Alois Alzheimer en 1907, publicándolo en el artículo titulado “Sobre una enfermedad grave y peculiar de la corteza cerebral” (caso original de Alois Alzheimer revisado, Strassnig y Ganguli, 2005). Alois Alzheimer describió a una mujer de 50 años de edad, Auguste Deter, que presentaba paranoia, problemas de memoria y sueño, agresividad y periodos de confusión. La paciente murió en 1906, 5 años tras la aparición de estos síntomas. Tras el análisis histológico del cerebro de esta paciente, Alois Alzheimer reportó la presencia de depósitos extracelulares (placas seniles) y agregados neurofibrilares (ovillos neurofibrilares) localizados principalmente en corteza e hipocampo. En 1910, otro psiquiatra alemán, Emil Kraepelin dio el nombre de AD a esta nueva entidad clínica y patológica, denominación que se sigue empleando hasta hoy.



## 1.2. Marcadores patológicos de la enfermedad de Alzheimer

En el cerebro de pacientes de AD están presentes dos estructuras características: las placas de  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) y los ovillos neurofibrilares.

Las placas son depósitos extracelulares insolubles que contienen principalmente fragmentos del péptido  $A\beta$ . Además de  $A\beta$ , las placas también contienen otros componentes como apolipoproteína E y proteoglicanos (Delacourte, 2005; Mott y Hulette, 2005). El péptido  $A\beta$  tiene una longitud variable de entre 39 y 43 aminoácidos y es un producto natural del metabolismo de la proteína precursora de  $A\beta$  (APP) (De Strooper, 2010). Las especies más abundantes de  $A\beta$  son  $A\beta_{40}$  y  $A\beta_{42}$ . Debido a su mayor agregación e insolubilidad  $A\beta_{42}$  es más abundante en las placas amiloides (Imbimbo et al., 2005; Mott y Hulette, 2005; Goedert y Spillantini, 2006).

Los ovillos neurofibrilares son agregados intracelulares que están principalmente compuestos por proteína Tau fosforilada. La proteína Tau normal promueve el ensamblaje de microtúbulos, que ayuda a organizar la arquitectura de la neurona y a asistir en el transporte de proteínas y vesículas que contienen enzimas esenciales para el mantenimiento y función celular (Delacourte, 2005). Cuando la proteína Tau está hiperfosforilada se disocia de los microtúbulos y se polimeriza formando filamentos helicoidales que darán lugar más tarde a los ovillos neurofibrilares.

## 1.3. Tipos de enfermedad de Alzheimer

AD se puede clasificar en dos tipos dependiendo de los factores genéticos asociados:

- AD esporádica. En general, es un tipo de enfermedad de inicio tardío, apareciendo los primeros síntomas después de los 65 años de edad. Representa el 90-95% del total de las personas que sufren AD y no presenta un patrón de herencia definido.
- AD familiar (FAD, por sus siglas en inglés). Es una enfermedad de inicio temprano, con una edad de aparición de los síntomas entre los 30 y los 65 años de edad

(Lopera Restrepo, 2012). FAD representa el 5-10% del total de pacientes de AD. Las familias con FAD tienen un fuerte componente genético y se hereda de forma autosómica dominante. La FAD está asociada a mutaciones en los siguientes genes: *APP*, en el cromosoma 21; *Presenilina 1 (PS1)*, en el cromosoma 14; y *Presenilina 2 (PS2)*, en el cromosoma 1 (Shastry, 1998). Las mutaciones en los genes de *presenilinas (PS)* conforman hasta el 90% de los casos descritos para FAD. La identificación de mutaciones en los genes *APP*, *PS1* y *PS2* en FAD ha supuesto un gran avance en el estudio de mecanismos fisiopatológicos asociados con AD.

#### 1.4. Proteína precursora del péptido $\beta$ -amiloide

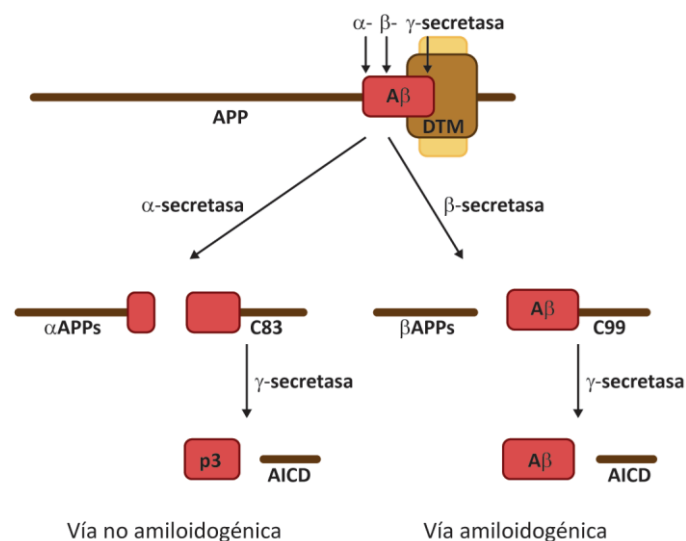
El péptido A $\beta$  deriva del procesamiento proteolítico de APP, una glicoproteína transmembrana de entre 695-770 aminoácidos que posee componentes extra e intracelulares (Imbimbo et al., 2005). Por *splicing* alternativo se generan al menos 10 isoformas diferentes de APP, lo que sugiere un papel potencial en la fisiología normal de la célula (Hardy y Allsop, 1991; Bayer et al., 2001; Imbimbo et al., 2005; Drachman, 2006). De estas isoformas, las más abundantes son las que contienen 695, 751 y 770 aminoácidos (Selkoe, 2001).

APP es procesado por tres tipos de proteasas:  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasa. El procesamiento puede ocurrir mediante dos rutas metabólicas que implican cortes secuenciales en las regiones extracelular y transmembrana: i) la vía no amiloidogénica, que implica la actividad secuencial de  $\alpha$ - y  $\gamma$ -secretasas y ii) la vía amiloidogénica, en la que la proteína sufre un procesamiento secuencial por  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasas.

La vía no amiloidogénica (Figura 1) supone un primer procesamiento de APP por  $\alpha$ -secretasas que corta en la parte extracelular a nivel del aminoácido 687, dando lugar a un fragmento N-terminal (NTF) soluble, sAPP $\alpha$ , que se libera al espacio extracelular. Como consecuencia, se genera un fragmento C-terminal (CTF) de 83 aminoácidos (C83) asociado a membrana. Este fragmento es procesado en la región transmembrana por el complejo  $\gamma$ -secretasa, dando lugar a un pequeño péptido de 23 aminoácidos (p3) que se libera al medio extracelular y a un fragmento citosólico de 57-59 aminoácidos (AICD, por

sus siglas en inglés) que corresponde al dominio intracelular de APP. Esta vía no produce péptido A $\beta$ , ya que el sitio de hidrólisis de  $\alpha$ -secretasa se encuentra en la región comprendida por el péptido (Checler, 1995; Ling et al., 2003). Se han identificado varias proteínas con actividad  $\alpha$ -secretasa, todas de la familia de las desintegrinas y las metaloproteasas (ADAM). Tres de los miembros de esta familia se han propuesto como los responsables de la actividad  $\alpha$ -secretasa que procesa a APP: ADAM17, ADAM10 y ADAM9 (Maccioni et al., 2001; Sisodia y St George-Hyslop, 2002; Van Gassen y Annaert, 2003).

Por otro lado, está la ruta amiloidogénica (Figura 1). En este caso,  $\beta$ -secretasa es la encargada del procesamiento inicial de APP generando un fragmento soluble que va al espacio extracelular, sAPP $\beta$ , y un CTF asociado a membrana de 99 aminoácidos (C99). El fragmento C99 es procesado por una segunda proteasa,  $\gamma$ -secretasa, dando lugar a un péptido de 40-42 aminoácidos (A $\beta$ ), que en última instancia es secretado al medio extracelular, y el fragmento AICD (Takami et al., 2009). La actividad  $\beta$ -secretasa se atribuye a la proteína BACE1 (del inglés,  *$\beta$ -site APP cleaving enzyme 1*) (Vassar et al., 1999, 2009).



**Figura 1. Esquema del procesamiento de APP.** Esquemas de las dos rutas metabólicas alternativas para el procesamiento de APP: Vía no amiloidogénica y vía amiloidogénica.

El péptido A $\beta$  bajo ciertas circunstancias puede formar agregados consistentes en oligómeros, los cuales subsecuentemente se polimerizan en grandes colecciones

fibrilares que llegan a formar placas (Imbimbo et al., 2005; Armstrong, 2006; Drachman, 2006).

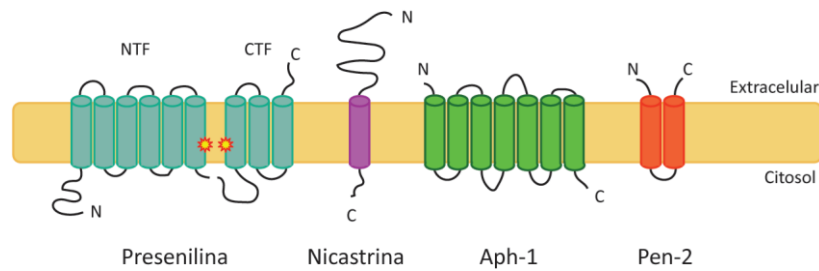
## 2. Presenilinas

PS1 y PS2 son proteínas homólogas de unos 50 kDa que representan la subunidad catalítica del complejo  $\gamma$ -secretasa y tienen un papel principal en la progresión de AD (Gertsik et al., 2015; Stanga et al., 2018). El ensamblaje y activación del complejo  $\gamma$ -secretasa ocurre gracias a la asociación de PS1 o PS2 con otras tres proteínas de membranas: Nicastrina, Aph-1 (Aph-1a o Aph-1b en humanos; Aph-1a, Aph-1b o Aph-1c en roedores) y Pen-2, dando lugar a cuatro y seis  $\gamma$ -secretasas diferentes en humanos y roedores, respectivamente (Serneels et al., 2005; Meckler y Checler, 2016; Stanga et al., 2018).

El ensamblaje del complejo activo  $\gamma$ -secretasa tiene lugar en orden temporal definido. Primero, Aph-1 y Nicastrina forman un complejo al que se incorpora PS. Posteriormente, PS se une al dominio transmembrana de Nicastrina. Finalmente, se ensambla Pen2 a PS y tiene lugar la endoproteólisis de PS para formar el complejo activo PS/ $\gamma$ -secretasa (Thinakaran et al., 1996). Los procesos de endoproteólisis dan lugar a fragmentos NTF y CTF de PS de 27-30 kDa y 16-20 kDa, respectivamente (Ho y Shen, 2011). La actividad proteolítica de PS está mediada por dos residuos de aspartato en las posiciones aminoacídicas 257 y 385 en el sexto y séptimo dominio transmembrana, respectivamente (Wolfe et al., 1999; Kimberly et al., 2000) (Figura 2).

Estudios recientes demuestran que la presencia de PS1 o PS2 en el complejo  $\gamma$ -secretasa determina su localización subcelular. Cuando el complejo  $\gamma$ -secretasa contiene PS1 se localiza principalmente en la membrana plasmática. Sin embargo, cuando el complejo  $\gamma$ -secretasa contiene PS2 se dirige al sistema retículo endoplásmico-Golgi y a un subconjunto de compartimentos endosómicos (Meckler y Checler, 2016). Además, la distribución celular de los complejos que contienen PS2 difiere según el componente Aph1. Esta discriminación entre ambas proteínas puede tener implicaciones obvias para

la especificidad de sustrato de los complejos  $\gamma$ -secretasa que contienen PS1 o PS2 (Meckler y Checler, 2016).



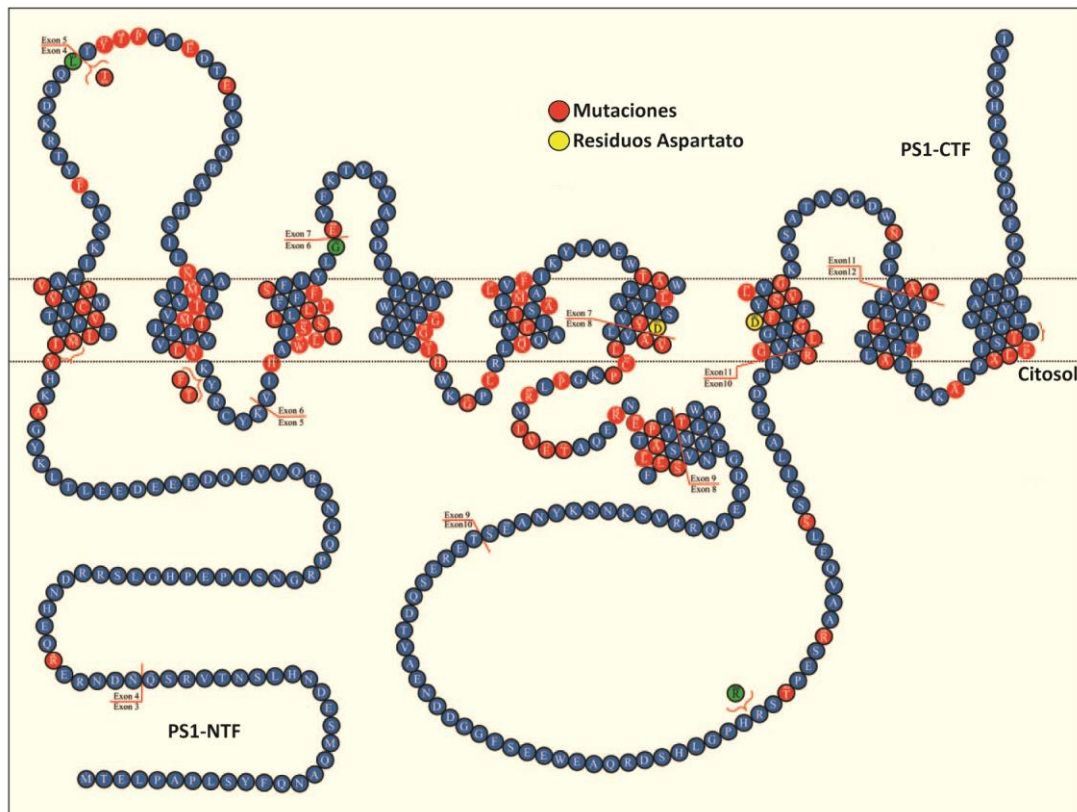
**Figura 2. Modelo topológico del complejo  $\gamma$ -secretasa.** El complejo  $\gamma$ -secretasa está formado por 4 proteínas: Presenilina (PS), Nicastrina, Aph-1 y Pen-2. PS tiene 9 dominios transmembrana y dos aspartatos conservados, 257 y 385, en los dominios 6 y 7 de PS, respectivamente (marcados con una estrella). Tras el ensamblaje con otros miembros del complejo  $\gamma$ -secretasa, PS se somete a endoproteólisis dentro del bucle que conecta los dominios 6 y 7 para formar un fragmento N-Terminal (NTF) y un fragmento C-terminal (CTF). Cada subunidad de PS contribuye con un aspartato al sitio activo.

## 2.1. Mutaciones en Presenilinas en la enfermedad de Alzheimer

Como se ha mencionado anteriormente, las mutaciones en *PS1* conforman el 90% de los casos de FAD. Actualmente se conocen más de 180 mutaciones en *PS1* asociadas a FAD ([www.alzforum.org](http://www.alzforum.org)). Estas mutaciones se distribuyen por toda la molécula, con una localización principal en los dominios transmembrana altamente conservados y en los residuos hidrofóbicos del NTF o del dominio hidrofóbico situado entre los dominios transmembrana 6 y 7 (Tandon y Fraser, 2002) (Figura 3). Por otro parte, la mayoría de las más de 35 mutaciones en *PS2* asociadas con FAD también se localizan en dominios transmembrana conservados y entre los dominios transmembrana 6 y 7 ([www.alzforum.org](http://www.alzforum.org)).

## 2.2. Presenilinas causan enfermedad de Alzheimer familiar por un mecanismo de pérdida de función

Existen dos opciones para explicar el tipo de herencia autosómica dominante de las mutaciones en genes de *PS* asociadas con FAD: i) que las mutaciones ocasionen una



**Figura 3. Muchas de las mutaciones descritas en PS1.** Esta imagen muestra la distribución de mutaciones de cambio de sentido, pequeñas inserciones y deleciones en PS1. Rojo: mutaciones en PS1. Amarillo: los dos sitios Aspartato (D257 y D385) que actúan como residuos catalíticos de PS1. Adaptado de Shen y Kelleher, 2007.

ganancia de función patológica (Hardy y Selkoe, 2002) o ii) que las mutaciones en *PS* generen una pérdida de función (Shen y Kelleher, 2007). Resolver esta pregunta tiene consecuencias clínicas evidentes. En el caso de que las mutaciones en genes de *PS* asociadas a FAD causaran una ganancia de función, la inactivación de la actividad de *PS* podría aliviar los síntomas. Por el contrario, aproximaciones farmacológicas que inhibieran la acumulación de sustratos relevantes podrían detener o aliviar el desarrollo de AD en el caso de que las mutaciones en *PS* actuaran por un mecanismo de pérdida de función.

Trabajos realizados a largo de los últimos años apoyan un mecanismo de pérdida de función de *PS*. Como se ha mencionado, las mutaciones en genes de *PS* asociadas con FAD se encuentran distribuidas por toda la proteína e incluyen deleciones, haciendo difícil reconciliar estos datos con una ganancia de función conferida por las mutaciones.

Por otra parte, las mutaciones en *PS1* asociadas con FAD resultan a menudo en el acúmulo de CTF de sus varios sustratos, de acorde con un mecanismo de pérdida de función. Además, evidencias *in vivo* apoyan una pérdida de función de PS como desencadenante de la cascada de eventos que conduce a AD. De forma interesante, la inactivación condicional de PS1 y PS2 (Beglopoulos et al., 2004; Saura et al., 2004; Wines-Samuelson et al., 2010) o de otro componente del complejo  $\gamma$ -secretasa como Nicastrina (Tabuchi, 2009) en el cerebro de ratón adulto producen pérdida progresiva de memoria, neurodegeneración, inflamación e hiperfosforilación de Tau generalizadas, indicando que la pérdida de función de PS/complejo  $\gamma$ -secretasa causa síntomas asociados a AD. La pérdida parcial de la función de PS en AD se ha visto reforzada en los últimos años por la generación de modelos de ratón *Knock-In* (KI) que reproduce mutaciones en *PS1* asociadas a FAD (PS1 KI) y por la caracterización de los complejos  $\gamma$ -secretasa originados por 138 mutantes de *PS1* causantes de FAD (Xia et al., 2015; Sun et al., 2017). En apoyo de un mecanismo patogénico de pérdida de función, ensayos clínicos en fase III con un número alto de pacientes tratados con inhibidores de la actividad PS/ $\gamma$ -secretasa se tuvieron que discontinuar debido al aumento de la incidencia de efectos adversos en los pacientes tratados, incluyendo un agravamiento cognitivo de los pacientes (Doody et al., 2013). El conjunto de estos y otros datos han llevado a postular la *hipótesis de Presenilinas*, según la cual la pérdida parcial de función de PS, con el probable acúmulo de CTFs de sus sustratos proteolíticos, supone un evento iniciador en AD que ocasiona defectos sinápticos y de memoria que preceden a la posterior neurodegeneración en los pacientes (Shen y Kelleher, 2007).

### 2.3. Funciones biológicas de Presenilinas

Durante los últimos años se han identificado un buen número de rutas y sustratos asociados con la actividad de PS (Haapasalo y Kovacs, 2011), indicando que PS deben participar en una gran variedad de funciones a lo largo de la vida. Las funciones de PS se pueden dividir en funciones independientes y dependientes del complejo  $\gamma$ -secretasa.

### 2.3.1. Funciones de Presenilinas independientes de actividad $\gamma$ -secretasas

Las funciones de PS independientes de la actividad del complejo  $\gamma$ -secretasa incluyen la estabilización de  $\beta$ -catenina en la ruta de señalización de Wnt y en la homeostasis de la regulación de  $\text{Ca}^{2+}$ .

$\beta$ -catenina es una proteína transductora de señal de la ruta de señalización de Wnt y también participa como molécula de adhesión celular.  $\beta$ -catenina lleva a cabo dos funciones de acuerdo a su localización celular: i) en membrana forma complejos con el dominio citoplásmico de la molécula de adhesión E-cadherina y ii) en el citoplasma,  $\beta$ -catenina está implicada en la ruta de señalización de Wnt, traslocándose al núcleo para participar en procesos de regulación génica. La acción de la glucógeno sintasa quinasa- $3\beta$  (GSK3 $\beta$ ) regula la fosforilación, ubiquitinación y degradación de  $\beta$ -catenina. La señalización de Wnt actúa como antagonista de la degradación de  $\beta$ -catenina, por tanto, en ausencia de Wnt la proteína de  $\beta$ -catenina se fosforila por acción de GSK3 $\beta$  y se degrada constitutivamente a través de la ruta ubiquitina-proteosoma (Huang y He, 2008; Zhang et al., 2013).

Diferentes estudios han mostrado que hay tres secuencias de fosforilación consenso conservadas en PS1 (Twomey y McCarthy, 2006; Duggan y McCarthy, 2016). La fosforilación de PS1 en uno de estos sitios por GSK3 $\beta$  regula la interacción entre PS1 y  $\beta$ -catenina (Kirschenbaum et al., 2001; Prager et al., 2007; Duggan y McCarthy, 2016). En los últimos años, se ha mostrado que mutaciones en *PS1* relacionadas con FAD inhiben la ruta de señalización de Wnt por aumento de la fosforilación y degradación de  $\beta$ -catenina (Kawamura et al., 2001; Duggan y McCarthy, 2016) e induce a la apoptosis en células neuronales (Zhang et al., 1998; Duggan y McCarthy, 2016).

Por otro lado, también se ha propuesto que existe relación de las PS con la formación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en el retículo endoplásmico y la regulación de la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Zhang et al., 2010, 2015). Se conoce que la interrupción en la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  precede a las patologías clásicas de AD como los ovillos neurofibrilares y las placas de A $\beta$ , y se propone que contribuya a la muerte celular neuronal durante la enfermedad (Bezprozvanny y Mattson, 2008). En numerosos



modelos de ratón de AD se han observado niveles basales elevados de  $\text{Ca}^{2+}$  y que las mutaciones relacionadas con FAD de PS producen cambios en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  (Tu et al., 2006; Nelson et al., 2010; Zhang et al., 2010; Jung et al., 2011). Hay otras evidencias que respaldan el papel de PS independiente de la actividad  $\gamma$ -secretasa en la regulación de la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  de las reservas intracelulares. Las PS interactúan con varias proteínas funcionalmente implicadas en la señalización del calcio como sorcina, calmodulina, calsenilina, calmirina y calpaína (Shinozaki et al., 1998; Stabler et al., 1999; Pack-Chung et al., 2000). También, se ha demostrado que las PS regulan los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de interacciones y activación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  como Ca-ATPasas (SERCA) (Green et al., 2008), el receptor de inositol trifosfato (InsP3R) (Cheung et al., 2008) y el receptor de Rianodina (RyR) (Hayrapetyan et al., 2008; Rybalchenko et al., 2008). Más recientemente, se ha descubierto que las PS modulan la regulación mediada por fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2) del potencial de receptor de transición de la melastatina relacionada con 7 (TRPM7) (Oh et al., 2012).

### 2.3.2. Funciones de Presenilinas dependientes de actividad $\gamma$ -secretasa

Las PS promueven la memoria y la supervivencia neuronal a través de un mecanismo dependiente de la actividad  $\gamma$ -secretasa, observación consistente con los descubrimientos que muestran que la inactivación condicional de Nicastrina, otro componente del complejo  $\gamma$ -secretasa, en corteza de cerebro adulto, también resultó en daño progresivo de la memoria, neurodegeneración e hiperfosforilación de Tau dependientes de la edad (Tabuchi et al., 2009).

Los sustratos de PS/ $\gamma$ -secretasa comparten varias características (Struhl y Adachi, 2000; Beel y Sanders, 2008). Estas características son i) la mayoría de los sustratos de PS/ $\gamma$ -secretasa son proteínas transmembrana de tipo I (Haapasalo y Kovacs, 2011), ii) actúan como proteínas de señalización y regulación celular (Bossy-Wetzel et al., 2004; Querfurth y LaFerla, 2010), iii) escinden preferentemente la proteína después del desprendimiento del ectodominio (Beel y Sanders, 2008), iv) la actividad del complejo PS/ $\gamma$ -secretasa tiene lugar en o cerca del límite de los dominios transmembrana y citoplásmico (Weihofen y Martoglio, 2003), v) la escisión mediada por PS/ $\gamma$ -secretasa

libera el dominio intracelular (ICD) de las proteínas sustrato al citosol (Okochi et al., 2002; Araki et al., 2004), vi) la inhibición de la actividad PS/ $\gamma$ -secretasa mediante inhibidores farmacológicos o por falta de función de PS, previenen la generación del ICD y da como resultado el acúmulo del CTF de manera análoga a  $\beta$ APP-CTFs (Haapasalo y Kovacs, 2011).

## 2.4. Diferentes sustratos de Presenilinas

Existe una gran variedad de sustratos de PS/ $\gamma$ -secretasa en base a su estructura, localización y funciones fisiológicas. Hasta el momento se han encontrado más de 90 sustratos de PS/ $\gamma$ -secretasa (Haapasalo y Kovacs, 2011). Éstos tienen funciones de señalización y regulación celular, interviniendo en procesos de determinación del sitio celular, adhesión, migración, crecimiento de neuritas y guía axonal y formación y mantenimiento de la sinapsis. De forma interesante, muchos de estos eventos son interrumpidos durante la neurodegeneración ocurrida en AD (Bossy-Wetzel et al., 2004; Querfurth y LaFerla, 2010).

EphA4, miembro de la familia del receptor de Efrina, se identificó como sustrato del complejo  $\gamma$ -secretasa y su proteólisis se potencia por actividad sináptica (Inoue et al., 2009; Ho y Shen, 2011). La sobreexpresión del dominio intracelular de EphA4 aumenta el número de espinas dendríticas a través de la activación de la vía de señalización de Rac (Inoue et al., 2009; Ho y Shen, 2011). Este hallazgo apoya los experimentos que muestran que los inhibidores del complejo  $\gamma$ -secretasa reducen la densidad de espinas *in vivo*.

Entre los sustratos del complejo  $\gamma$ -secretasa se encuentran proteínas de adhesión. Las N-Cadherinas pertenecen a la familia de las Cadherinas, una gran familia de proteínas transmembranas (>100) que tienen un papel fundamental en adhesión celular y morfogénesis (Krauss et al., 2005; Halbleib y Nelson, 2006; Niessen et al., 2011). Las N-Cadherinas se encuentran flanqueando la zona activa en la sinapsis y tienen un papel crucial en el proceso de formación y mantenimiento de la sinapsis (Togashi et al., 2002; Giagtzoglou et al., 2009). El ICD de N-Cadherinas generado por el procesamiento mediado por  $\gamma$ -secretasa actúa como represor transcripcional que migra al núcleo y se

une a la proteína CBP, promoviendo su degradación con la consecuente inhibición de la transcripción de genes implicados en la función y plasticidad del sistema nervioso mediado por CBP/CREB. De esta forma, la inhibición de la función de PS incrementa los niveles de CBP en el núcleo y la transcripción mediada por CREB-CBP (Marambaud et al., 2003). En células epiteliales, las PS se concentran en los sitios de contacto entre células, asociándose por el lado intracelular a las cateninas,  $\beta$ -catenina y  $\gamma$ -catenina, promoviendo la estabilización del complejo cadherina-catenina y su asociación al citoesqueleto de actina (Parisiadou et al., 2004). La escisión de E-Cadherina por el complejo  $\gamma$ -secretasa promueve el desensamblaje del complejo de adhesión Cadherina-Catenina. Otras proteínas de esta familia son también sustratos de PS/ $\gamma$ -secretasa como VE-cadherinas (Marambaud et al., 2002) y protocadherinas (Haas et al., 2005; Hamsch et al., 2005; Bonn, Seeburg et al., 2007).

Otras de las proteínas sustrato del complejo PS/ $\gamma$ -secretasa son las proteínas Notch 1-4. Las proteínas de la familia Notch median la señalización de corto alcance controlando las decisiones del destino celular, el modelado de la expresión génica y mantenimiento de las poblaciones de células madre durante desarrollo. La señalización de Notch en estos eventos requiere la activación de Notch y la posterior liberación mediada por la actividad PS/ $\gamma$ -secretasa de Notch-ICD (NICD), que regula la transcripción de genes (Louvi y Artavanis-Tsakonas, 2006; Fiúza y Arias, 2007).

La proteína que ha tenido más relevancia entre los diferentes sustratos de PS por su relación con AD es APP. El procesamiento de APP por PS da lugar a los péptidos A $\beta$  que conforman las placas amiloides características de AD. Las mutaciones de PS asociadas a FAD mejoran selectivamente la producción de péptido A $\beta_{42}$ , a menudo a expensas de una menor generación de A $\beta_{40}$  (Moehlmann et al., 2002; Schroeter et al., 2003). Estos datos han servido de apoyo para la *teoría amiloidogénica* que postula que la producción exacerbada por PS de formas largas del péptido A $\beta_{42}$  es responsable del desarrollo de AD (Hardy y Selkoe, 2002). Sin embargo, no está claro que PS promuevan los déficits de memoria y de supervivencia neuronal a través del procesamiento de APP, cuestionándose si es el único sustrato patogénico del complejo  $\gamma$ -secretasa. Por ejemplo, los pacientes de FAD que portan mutaciones en genes de PS desarrollan la enfermedad a una edad significativamente más temprana que aquellos pacientes que presentan

mutaciones en APP (Ryman et al., 2014). Estudios de PET o análisis *postmortem* han mostrado que existen individuos de edad avanzada con una carga de placas amiloide elevada sin síntomas de demencia o síntomas muy leves. No se trata de un caso puntual, sino que puede corresponder entre un cuarto y un tercio de las personas ancianas con defectos cognitivos nulos o mínimos (Herrup, 2015). El hallazgo de depósitos de amiloide en cerebros de individuos sin demencia indica que el péptido A $\beta$  no es suficiente para causar AD. Además, la sobreproducción de A $\beta$  incluyendo A $\beta_{42}$  no produce neurodegeneración en ratones (Games et al., 1995; Hsiao et al., 1996; Mucke et al., 2000), sugiriendo que la sobreproducción de A $\beta$  puede ser insuficiente para iniciar la neurodegeneración (Kim et al., 2013). Por otra parte, los ratones KI de mutaciones de PS1 asociadas a FAD reducen los niveles de A $\beta_{40}$  y A $\beta_{42}$ , de acorde con un mecanismo de pérdida de función (Xia et al., 2015). Esta reducción es de mayor magnitud en las formas cortas (A $\beta_{40}$ ) que en las formas largas (A $\beta_{42}$ ), explicando el ligero aumento en el ratio A $\beta_{42}$ /A $\beta_{40}$ . En otras palabras, los niveles totales de A $\beta_{42}$  son mayores en cerebros de ratones control que en ratones PS1 KI. Estos estudios proponen dos rutas paralelas relacionadas con AD, una dependiente de la producción del péptido A $\beta$ , que ocasiona la formación de placas, y otra independiente del péptido A $\beta$  que causa la disfunción sináptica, el deterioro de la memoria y neurodegeneración dependiente de la edad.

En resumen, los hallazgos en humanos y en ratón han puesto en entredicho que el papel lineal del acúmulo de A $\beta$  postulado por la *teoría amiloidogénica* sea suficiente para explicar la enfermedad (Herrup, 2015). Aunque de ninguna manera el posible papel patológico de A $\beta$  se pueda descartar por completo, el avance de la investigación en AD requiere la identificación de nuevos sustratos con un impacto en el desarrollo de la enfermedad. Por tanto, la identificación de los sustratos moleculares de PS responsables de la disfunción sináptica y la neurodegeneración causada por la pérdida de PS proporcionarán nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de AD (Ho y Shen, 2011).

En los últimos años, nuestro grupo de investigación ha identificado un sustrato sináptico de PS/ $\gamma$ -secretasa con un papel potencial en AD, las Neurexinas (Nrxs) (Saura et al., 2011; Servián-Morilla et al., 2018).

### 3. Neurexinas

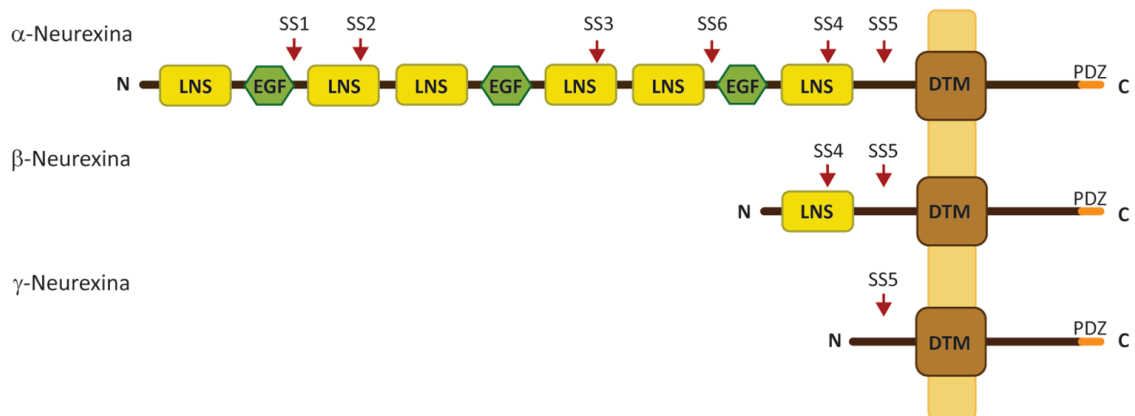
El veneno de la araña viuda negra contiene una toxina específica de vertebrados, la  $\alpha$ -latrotoxina. La liberación de  $\alpha$ -latrotoxina produce liberación masiva de neurotransmisores (Yuri et al., 2008). Las Nrxs se descubrieron originalmente como receptores para  $\alpha$ -latrotoxina (Ushkaryov et al., 1992).

Las Nrxs de mamíferos son proteínas de membrana de tipo I codificadas por 3 genes (Nr $x$ 1-3, en ratones y NR $X$ 1-3 en humanos) que expresan 2 isoformas principales,  $\alpha$ Nr $x$ s y  $\beta$ Nr $x$ s (Ushkaryov et al., 1992, 1993, 1994) (Figura 4). Recientemente se ha descubierto un promotor alternativo situado 3' que da lugar a una tercera isoforma sólo codificada por Nr $x$ 1, las  $\gamma$ Nr $x$ s (Sterky et al., 2017) (Figura 4). Las distintas isoformas de Nr $x$ s presentan diferentes secuencias extracelulares. Las  $\alpha$ Nr $x$ s, isoforma larga, están compuestas por una región extracelular que contiene seis dominios de unión a laminina/neurexina/globina de unión a hormonas sexuales (LNS, del inglés *laminin-neurexin-sex hormone binding globulin*) y tres dominios de factor de crecimiento epidermal (EGF, del inglés *epidermal growth factor-like*); mientras que la secuencia de la región extracelular de  $\beta$ -Nr $x$ s, la isoforma corta, sólo incluye el último dominio LNS de  $\alpha$ Nr $x$ s (Südhof, 2017). La región citoplasmática de los distintos genes de Nr $x$ s está altamente conservada (Figura 4).

Las Nr $x$ s sufren *splicing* alternativo en seis sitios conservados (SS1-SS6) dando lugar a más de 1000 isoformas que son expresadas en el cerebro creando, de esta forma, la gran diversidad molecular que debe contribuir a la diversidad sináptica (Schreiner et al., 2014; Treutlein et al., 2014). Las  $\alpha$ Nr $x$ s contienen los sitios de *splicing* SS1-SS6, mientras que las  $\beta$ Nr $x$ s sólo contienen los sitios de *splicing* SS4 y SS5 (Ushkaryov et al., 1992, 1994), y las  $\gamma$ Nr $x$ s sólo el SS5 (Sterky et al., 2017). La incorporación o exclusión de los exones situados en estos sitios de *splicing* originan la formación de las isoformas SS+ o SS-, respectivamente.

Los SS1-4 implican secuencias cortas ( $\leq 30$  residuos) y están localizados en los dominios LNS o cercanos a éstos. Estos SS están conservados en las 3 Nr $x$ s. Sin embargo, SS5 sólo implica 3 residuos en Nr $x$ 1, pero 191 residuos en Nr $x$ 2. En Nr $x$ 3, SS5 presenta

una gran diversidad de insertos de secuencia que incluyen múltiples variantes con codones de parada (Ushkaryov y Südhof, 1993; Ullrich et al., 1995).



**Figura 4. Esquema de las distintas isoformas de Nrxs.** LNS: dominio de unión a laminina/neurexina/ globina de unión a hormonas sexuales; EGF: factor de crecimiento epidermal; DTM: dominio transmembrana; C: cola citoplásmica; PDZ: sitio de unión a dominios PDZ; SS: sitio de *splicing* alternativo.

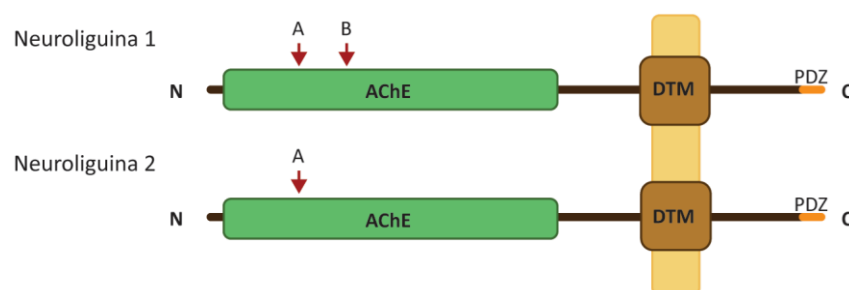
Las Nrxs actúan predominantemente en los terminales presinápticos de neuronas y juegan un papel esencial en la neurotransmisión y en la diferenciación sináptica mediante la unión con proteínas situadas a ambos lados de la sinapsis.

La región yuxtamembrana del dominio intracelular común de Nrxs se une a la proteína 4.1, que sirve de anclaje del citoesqueleto de actina a la membrana plasmática (Biederer y Südhof, 2001). En el extremo C-terminal intracelular las Nrxs presentan un sitio de unión a proteínas con dominio PDZ formado por los tres últimos aminoácidos del dominio citoplásmico. A través de este dominio, las Nrxs interactúan con el complejo formado por CASK (del inglés, *calcium/calmodulin dependent serine protein kinase*), Mint y Veli, un complejo de proteínas formado por componentes de la maquinaria de liberación de neurotransmisores (Butz et al., 1998). A través de estas u otras interacciones, Nrxs podrían tener un papel relevante en la exocitosis de las vesículas sinápticas, ya que a su vez, este complejo se asocia con subunidades de canales de calcio voltaje dependientes (CCVD) y con la proteína reguladora de la zona activa,  $\alpha$ -liprina. Mint interactúa con Munc18, que participa en el reclutamiento de vesículas sinápticas en el terminal presináptico (Dean y Dresbach, 2006).

En el otro extremo, el dominio extracelular de Nrxs es altamente polimórfico regulando la interacción con proteínas postsinápticas. De esta forma, Nrxs acoplan eventos de adhesión trans-sináptica mediante el dominio extracelular altamente variable, con reclutamiento de ligandos sinápticos y regulación de la liberación de neurotransmisores desde el dominio citoplásmico conservado (Boucard et al., 2006; Ko et al., 2009; Rabaneda et al., 2014; Aoto et al., 2015). Entre los ligandos extracelulares de Nrxs destacan neuroliguinas (NLgns), proteínas LRRTM, neurexofilinas, distroglicanos y cerebelinas.

### 3.1. Neuroliguinas como ligandos postsinápticos de Neurexinas

Las NLgns son proteínas de adhesión celular que interaccionan transinápticamente con Nrxs y regulan aspectos claves de la formación, maduración, plasticidad y mantenimiento de la sinapsis excitatorias e inhibitorias (Scheiffele et al., 2000; Dean et al., 2003; Baudouin y Scheiffele, 2010; Krueger et al., 2012; Reissner et al., 2013). Al igual que Nrxs, las NLgns son proteínas de membrana tipo I pero presentan una estructura más simple y una menor diversidad. En humanos existen 5 genes de NLgns (NLGN1-4X y 4Y) y 4 en ratón (NLgn1-4). Las NLgns están conformadas por un dominio extracelular compuesto por un único dominio homólogo a acetilcolinesterasa sin actividad catalítica, un segmento transmembrana y un dominio intracelular corto (Figura 5). Todas las NLgns sufren *splicing* alternativo en una única posición (SS A), menos NLgn1, que tiene una segunda posición de *splicing* (SS B) (Ichtchenko et al., 1996; Boucard et al., 2005; Südhof, 2008).



**Figura 5. Esquema de las isoformas neuroliguina-1 y neuroliguina-2.** AChE: acetilcolinesterasa; DTM: dominio transmembrana; C: cola citoplásmica; PDZ: sitio de unión a dominios PDZ; A y B: sitios de *splicing* alternativo.

En el extremo intracelular las Nlgn presentan un sitio de unión a dominios PDZ a través del cual median interacciones con proteínas de andamiaje del terminal postsináptico, como PSD95 (del inglés, *postsynaptic density protein 95*) (Irie et al., 1997; Graf et al., 2004).

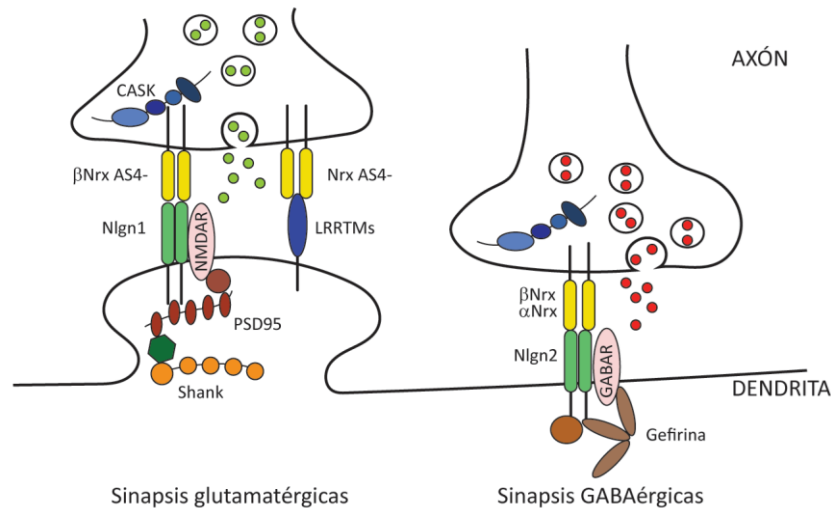
La naturaleza de la unión entre Nrxs y Nlgn ha sido estudiada mediante experimentos de carácter genético, bioquímico y biofísico. Estas investigaciones han demostrado que la interacción entre Nrxs y Nlgn está regulada por una alta variedad de mecanismos moleculares y celulares entre los que se encuentran el *splicing* alternativo, la unión a calcio, procesos de glicosilación u oligomerización (Lisé y El-Husseini, 2006).

Experimentos de inmunocolocalización han permitido descubrir una distribución diferencial de las distintas Nlgn en diferentes tipos de sinapsis. De esta forma, Nlgn1 está presente en sinapsis excitatorias (Song et al., 1999), donde a través de su motivo de unión a dominios PDZ se une con la proteína de andamiaje postsináptico PSD95 (Irie et al., 1997) e indirectamente con Shank (*SH3 and multiple ankyrin repeat domains*) (Naisbitt et al., 1999). Por otra parte, Nlgn2 se localiza en las sinapsis inhibitorias, donde interacciona con la proteína de andamiaje Gefirina (Graf et al., 2004; Varoqueaux et al., 2004; Pouloupoulos et al., 2009). Nlgn3, en cambio, se encuentra tanto en sinapsis glutamatérgicas como GABAérgicas (Budreck y Scheiffele, 2007). La selectividad de los efectos mediados por Nlgn1 y Nlgn2 en diferentes tipos de sinapsis concuerda con las observaciones *in vivo*. El ratón KO de *Nlgn1* presenta defectos en la transmisión glutamatérgica, con un menor ratio NMDA/AMPA, mientras que el KO de *Nlgn2* tiene un descenso en la respuesta sináptica inhibitoria (Chubykin et al., 2007). En contraste con los datos electrofisiológicos y a diferencia de lo que ocurre con los experimentos de sobreexpresión en cultivo, la delección de Nlgn *in vivo* no afecta a la densidad sináptica (Varoqueaux et al., 2006).

Las diferentes isoformas y variantes debidas al *splicing* alternativo determinan la interacción entre las distintas isoformas de Nrxs y Nlgn. La presencia del inserto B en Nlgn1 impide que ésta interaccione con  $\beta$ -Nrxs SS4+ o con  $\alpha$ -Nrxs, pero si permite su interacción con isoformas de  $\beta$ -Nrxs SS4- (Ichtchenko et al., 1995; Boucard et al., 2005).



Por otro lado  $\alpha$ -Nrxs SS4+, interaccionan con Nlgn1 –B, Nlgn2 y Nlgn3 (Koehnke et al., 2010; Miller et al., 2011). En el caso de Nlgn2, ésta interacciona con  $\alpha$ - y  $\beta$ -Nrxs independientemente de la presencia del inserto SS4 (Chih et al., 2006) (Figura 6).



**Figura 6. Interacción de Nrxs con distintos ligandos en sinapsis glutamatérgicas y GABAérgicas.**

Las  $\alpha$ Nrxs y las  $\beta$ Nrxs pueden interactuar con dímeros de Nlgns a través del espacio sináptico para regular importantes aspectos de establecimiento, diferenciación y maduración de la sinapsis. En las sinapsis glutamatérgicas, Nlgn1 aumenta la densidad sináptica y estimula la probabilidad de liberación de neurotransmisores por un mecanismo que depende de su interacción transináptica con Nrxs (Dean et al., 2003; Chih et al., 2006).

La identificación durante los últimos años de otras proteínas de adhesión sináptica ha puesto de manifiesto la existencia de mecanismos alternativos que colaboran con el sistema Nrxs/Nlgns en la formación y función sinápticas. Entre ellos, destacan otros ligandos postsinápticos de Nrxs, como LRRTMs (*Leucine-rich-repeat transmembrane*), proteínas transmembrana que se unen a Nrxs carentes del inserto AS4 durante la formación de sinapsis glutamatérgicas (de Wit et al., 2009; Ko et al., 2009). Se ha descrito también la unión selectiva a isoformas Nrxs AS4- por parte de otros ligandos, como distroglicanos y latrofilinas (Boucard, Ko et al., 2012; Sugita et al., 2001). En la misma línea, existen moléculas que se unen específicamente a  $\alpha$  o  $\beta$ Nrxs. Por ejemplo, las proteínas postsinápticas Calsinténinas se unen a  $\alpha$ Nrxs e inducen la formación de

sinapsis excitatorias e inhibitorias sobre interneuronas (Pettem et al., 2013). Recientemente se ha descubierto un mecanismo adicional mediado por moléculas de secreción que hacen de puente entre miembros de Nrxs y proteínas postsinápticas. Es el caso de las cerebelinas (Cblns), glicoproteínas que conectan Nrxs AS4+ con el receptor GluD2 (Uemura et al., 2010) y de la proteína Hevin, secretada por los astrocitos hace de puente entre  $\alpha$ Nrxs y Nlgn1 +B, isoformas que en otras condiciones no se asociarían (Singh et al., 2016). El elevado número de proteínas de adhesión transináptica identificadas hasta la fecha junto con la complejidad de las interacciones que realizan, indica la importancia de su función y predice una redundancia parcial en los circuitos neuronales *in vivo*, donde pueden actuar hasta cierto punto en paralelo. En otras palabras, el efecto ocasionado por la ausencia de uno de estos sistemas dependerá del papel específico realizado por dicha proteína y del enmascaramiento funcional realizado por sistemas alternativos con funciones solapantes que puedan coexistir en las mismas sinapsis.

Mutaciones en los genes *NLGN2*, *NLGN4X* y *NRX1* se han identificado en enfermedades del neurodesarrollo incluyendo autismo y esquizofrenia (Jamain et al., 2003; Laumonnier et al., 2004; Kim et al., 2008; Rujescu et al., 2009; Camacho-Garcia et al., 2012, 2013; Lowther et al., 2017), indicando un posible papel de la disfunción sináptica de Nlgns y Nrxs en enfermedades cerebrales. Sin embargo, se desconocía un papel de Nrxs en enfermedades neurodegenerativas.

### 3.2. Antecedentes I: Neurexinas como sustrato de presenilinas

Los resultados expuestos a continuación se publicaron por nuestro grupo en el artículo “Presenilin/ $\gamma$ -secretase regulates Neurexins processing at synapses” en Plos One (Saura et al., 2011).

En este estudio se demostró que las Nrxs se procesan secuencialmente por una actividad metaloproteasa y PS/ $\gamma$ -secretasa (Figura 7A). Esta demostración se llevó a cabo mediante experimentos de transfección de cultivos de células HEK293 con un vector de expresión de  $\beta$ Nrx1 etiquetado con el epítipo HA (HA- $\beta$ Nrx1) y el uso de inhibidores de metaloproteasas (GM6001) y de PS (DAPT) (Figura 7B). Se observó que GM6001 reducía

los niveles del NTF de  $\beta$ Nrx1 liberados al medio, mientras que DAPT produjo el acúmulo del CTF de Nrxs (NrxCTF) sin afectar a la generación de NTF de  $\beta$ Nrx1. El bloqueo de la actividad de PS con DAPT también produjo el acúmulo de NrxCTF originado de otras isoformas de Nrxs, como  $\alpha$ Nrx1 y  $\alpha$ Nrx2, indicando que el procesamiento por PS es un evento general en Nrxs.

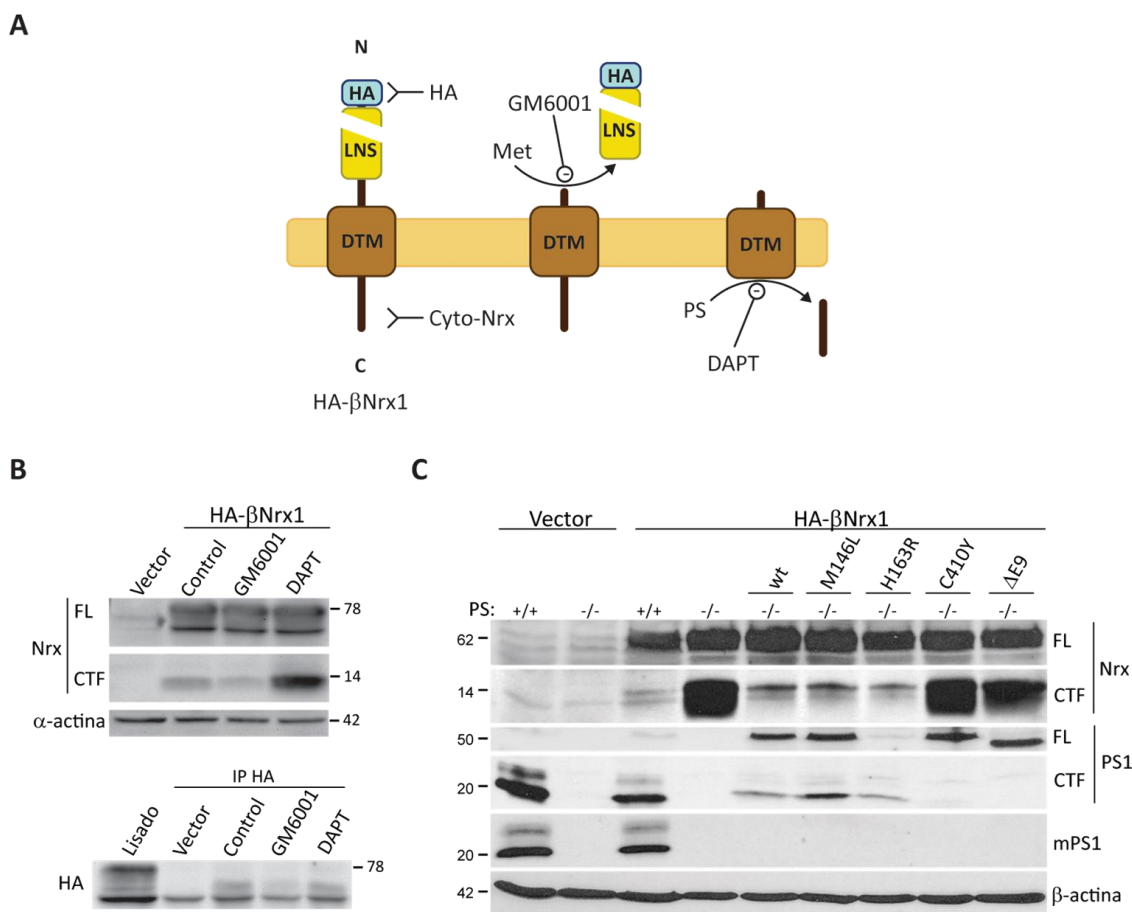
La inhibición de la actividad PS/ $\gamma$ -secretasa por uso de inhibidores farmacológicos (DAPT) o genéticos (mutaciones en PS), también induce una acumulación drástica de NrxCTF en neuronas *in vitro e in vivo* (Figura 8). NrxCTF se acumula en los terminales glutamatérgicos de cultivos de neuronas de hipocampo deficientes en la actividad PS/ $\gamma$ -secretasa y en las fracciones presinápticas de ratones dobles KO condicionales para PS1 y KO para PS2 (PS cDKO) que carecen de expresión de PS1 y PS2 en neuronas glutamatérgicas del prosencéfalo (Saura et al., 2004, 2011). La localización presináptica se demostró mediante fraccionamiento de sinaptosomas en corteza de ratones PS cDKO, donde nuestro grupo observó que el acúmulo de NrxCTF ocurría principalmente en terminales presinápticos (Figura 9).

Estos resultados indican que PS regula el procesamiento sináptico del fragmento NrxCTF dependiente de  $\gamma$ -secretasa, que consecuentemente se acumula en compartimentos sinápticos ante una falta de función de PS. Estos datos están en consonancia con la localización presináptica de PS y de sus sustratos, como APP-CTF (Saura et al., 2005; C. Zhang et al., 2009).

El acúmulo de NrxCTF en terminales presinápticos de los ratones PS cDKO coincide con los daños observados en la sinapsis y en memoria iniciales que preceden a la neurodegeneración de estos ratones. Estos resultados sugirieron que la inhibición del procesamiento de Nrxs causado por la pérdida de función de PS participa de los déficits en plasticidad sináptica y en memoria, y por tanto, que Nrxs son candidatas potenciales para mediar los defectos asociados a la pérdida de función de PS en FAD.

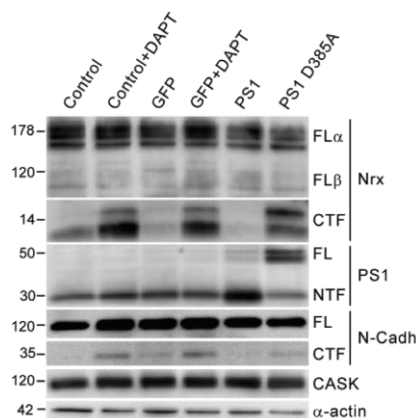
En este sentido, encontramos que algunas de las mutaciones de *PS1* asociadas a AD (PS1 C410Y y PS1  $\Delta$ E9) causan un efecto de pérdida de función sobre el procesamiento de  $\beta$ -Nrxs, reforzando la hipótesis que el procesamiento anormal de Nrxs puede contribuir a la aparición de síntomas asociados a AD en pacientes (Figura 7C).

Estos resultados se apoyan del estudio de otros grupos de investigación en los que muestran que el procesamiento de  $\text{Nr}3\beta$  se ve alterado por varias mutaciones de PS1 en la subunidad catalítica del complejo  $\gamma$ -secretasa asociadas a FAD. De los diferentes mutantes de PS1 que analizan se observa que en PS1 L166P y PS1 P436Q hay un fuerte aumento en el acúmulo de CTFs de  $\text{Nr}CTF$  con respecto al control *wild type*, y con el



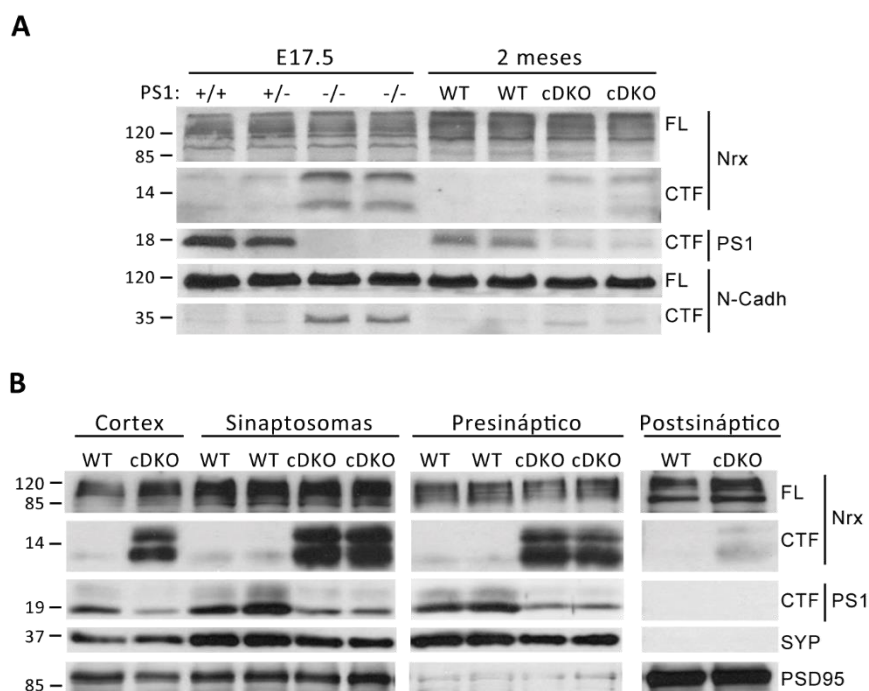
**Figura 7. Procesamiento secuencial de Nrxs por metaloproteasas y PS/ $\gamma$ -secretasa.** **A**, Modelo del procesamiento secuencial de Nrxs. Están marcados los anticuerpos utilizados para la detección de la etiqueta HA en el extremo N-terminal (anti-HA) y para la detección del CTF (anti-Cyto-Nrx). **B**, Células HEK293 transfectadas con vector o con HA- $\beta$ Nrx1 y tratadas con DMSO (control), con GM6001 o con DAPT. Panel superior, *Western blot* de lisados celulares con el anticuerpo anti-Cyto-Nrx. Panel inferior, *Western blot* con un anticuerpo anti-HA de inmunoprecipitados anti-HA de medio condicionado de células transfectadas. Un lisado de células HEK293 transfectadas con HA- $\beta$ Nrx1 se incluye en el mismo inmunoblot para hacer notar la diferencia de peso molecular con el *Full-Lenght* del ectodominio liberado al medio. **C**, Células MEF PS $^{+/-}$  o PS $^{-/-}$  transfectadas con vector o cotransfectadas con HA- $\beta$ Nrx1 y vector vacío, PS1 *wild type* o mutantes de PS1 relacionados con AD (PS1 M146L, PS1 H163R, PS1 C410Y o PS1  $\Delta$ E9). Análisis con Cyto-Nrx (Nr), N-Cadherina (N-cad), PS1 y Nicastrina (Nct). Paneles **B**, **C**, adaptados de Saura et al., 2011.

mutante de delección PS1  $\Delta E9$  sólo hubo un ligero aumento de NrxC<sub>TF</sub> (Bot, 2011). El conjunto de estos resultados sugiere que PS regula la función sináptica y el procesamiento de Nrxs en las sinapsis glutamatérgicas y que el daño en el procesamiento de Nrxs por PS podría tener un papel clave en la FAD.



**Figura 8. Acúmulo de NrxC<sub>TF</sub> en neuronas hipocámpales deficientes en actividad PS/γ-secretasa mediante experimentos de Western blot.** Cultivo de neuronas hipocámpales no infectados (control) e infectados con lentivirus GFP, PS1 o con el mutante dominante negativo PS1 D385A. Se analizaron los niveles totales de Nrxs, PS1, N-Cadherina (N-Cadh) y CASK. Adaptado de Saura et al., 2011.

Como apoyo a estos resultados, en nuestro grupo de investigación se realizaron aproximaciones de genética humana en unos 3000 pacientes y controles de AD esporádico, seguido de un estudio de 1700 pacientes/controles españoles. Se identificó una asociación sugestiva con NRX3 en hombres con AD (Martinez-Mir et al., 2013). En otro estudio, identificamos una mutación en heterocigosis de cambio de pauta de lectura en NLGN1 (NLGN1 Thr271fs) en un caso familiar de AD. La paciente presentó neurodegeneración cortical por MRI y se descartó la presencia de otras mutaciones relacionadas con FAD en PS1, PS2 y APP. La expresión del mutante NLGN1 Thr271fs en neuronas de hipocampo en cultivo confirmó que el alelo mutante producía una proteína no funcional, indicando una reducción del 50% en los niveles de Nlgn1 en la paciente (Tristán-Clavijo et al., 2015). Estos datos demostraron por primera vez la presencia de mutaciones con efecto patogénico en AD en la ruta de NrxC-Nlgn1.



**Figura 9. Acúmulo de NrxCtf en fracciones sinápticas de ratones PS cDKO.** **A**, Lisados de cerebro de embriones (E17.5) de ratones PS1+/+, PS1+/- y PS1-/- o ratones *wild type* (WT) y PS cDKO analizados por Western blot con anticuerpo anti-Cyto-Nrx (NrxC), anti-PS1 y anti-N-Cadherina (N-Cadh). El aumento de los niveles de N-Cadherina-CTF coincide con el descenso de la expresión de PS en los animales sin PS. **B**, Acúmulo de NrxCtf en purificaciones sinaptosomales y en fracciones sinápticas de ratón PS cDKO. Lisados de corteza cerebral y fracciones pre- y postsinápticas. Analizado mediante Western blot con anti-Cyto-Nrx (NrxC), PS1, sinaptofisina (SYP) (enriquecido en terminales presinápticos) y PSD95 (enriquecido en terminales postsinápticos). FL: proteína completa. Adaptado de Saura et al., 2011.

### 3.3. Antecedentes II: Neurexinas median los defectos sinápticos originados por la falta de función de Presenilinas

Los resultados expuestos a continuación provienen de la publicación de nuestro grupo titulada “Proteolytic processing of Neurexins by Presenilins sustains synaptic vesicle release” en *Journal of Neuroscience* (Servián-Morilla et al., 2018).

El estudio de la función de PS ha demostrado un papel esencial en la liberación de glutamato y la inducción de LTP (del inglés, *Long Term Potentiation*) en el hipocampo mediante un mecanismo esencialmente presináptico. De esta forma, se ha demostrado que la ablación genética de *PS1/2* selectivamente en neuronas de la región CA3 del

hipocampo reduce la liberación de glutamato e inhibe la inducción de LTP en las sinapsis de CA3-CA1 del hipocampo (colaterales de Schaeffer) (Zhang et al., 2009). Por el contrario, la ablación genética de *PS1/2* en las neuronas CA1 no tuvo ningún efecto en las mismas sinapsis (Zhang et al., 2009). Estos datos han mostrado que PS ejerce una función principal en el terminal presináptico regulando los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$ , la liberación de neurotransmisor y la inducción posterior de LTP. Resulta evidente destacar que el acúmulo de sustratos de PS relevantes en AD debería recapitular total o parcialmente los defectos ocasionados por la falta de función de PS. Por tanto, es de esperar que el acúmulo de sustratos no procesados de PS en terminales presinápticos glutamatérgicos medie los defectos en la liberación de neurotransmisor y de plasticidad sináptica. Basados en la función de Nrxs, en la liberación de neurotransmisor y el acúmulo de NrxCtf en terminales presinápticos glutamatérgicos, en nuestro laboratorio postulamos que Nrxs podrían mediar los defectos en liberación glutamatérgica asociados a una pérdida de función de PS en FAD.

Para analizar efectos en la función presináptica, en el grupo desarrollamos abordajes basados en expresión de sondas sinápticas fluorescentes que nos han permitido analizar los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  y la liberación de neurotransmisor en terminales glutamatérgicos mediados por Nrxs-Nlgn1 y adaptar estos métodos a neuronas de hipocampo que carecen de la función de PS (Figura 10). Mediante la aplicación de estos sistemas hemos demostrado que la adhesión trans-sináptica de Nrxs con Nlgn1 incrementa la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y la probabilidad de liberación en terminales glutamatérgicos (Serván-Morilla et al., 2018) (Figura 10). Además, demostramos que el aumento en la probabilidad de liberación mediado por Nrxs requiere de la actividad de PS, ya que la inhibición farmacológica de PS o la escisión de *PS1/2* en cultivos de neuronas de hipocampo produce el acúmulo de NrxCtf en los terminales presinápticos y reduce la probabilidad de liberación (Serván-Morilla et al., 2018) (Figura 10).

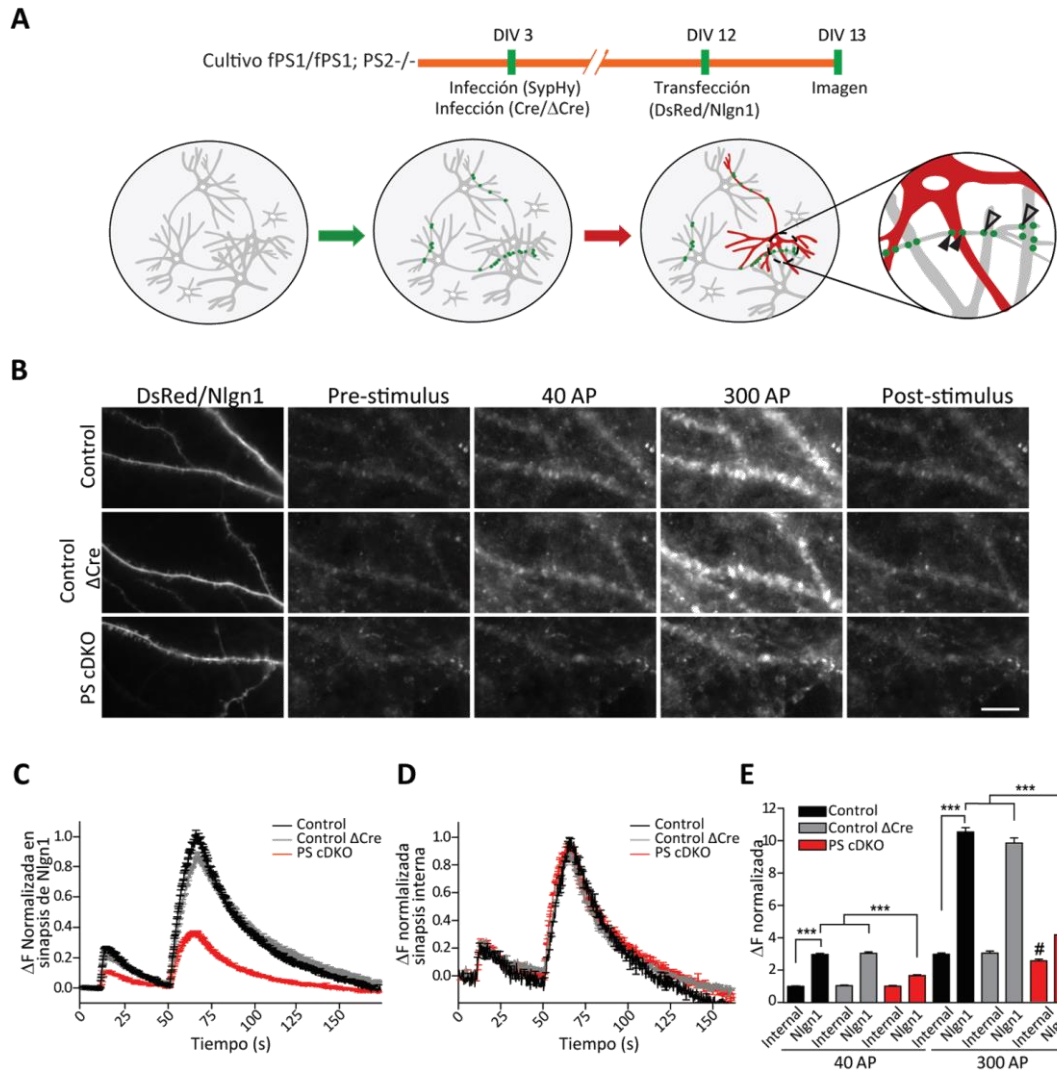
La confirmación experimental de que NrxCtf es el sustrato de PS que media los defectos en la probabilidad de liberación, requiere simular la falta de procesamiento hacia NrxCtf sin afectar la actividad general de PS hacia el resto de sustratos, un reto experimental importante. Para ello, se generaron mutantes con deleciones crecientes en el dominio yuxtamembrana extracelular de  $\beta\text{NrxCtf}$  y se analizaron los fragmentos

NrxNTF y NrxCTF producidos por dichos mutantes en células HEK293T, mediante experimentos de inmunoprecipitación del medio condicionado y de *Western blot* de lisados totales, respectivamente (Figura 11B). De esta manera, comprobamos que una delección que comprende selectivamente los residuos 386-393 inhibe la liberación al medio de NrxNTF y la acumulación de NrxCTF, de acuerdo con un procesamiento proteolítico secuencial. Estos resultados mostraron que el sitio responsable de la liberación del ectodominio y la consiguiente generación de NrxCTF está comprendido entre los residuos 386 y 393 de Nrx1 (Figura 11C). Trabajos recientes de otro grupo han demostrado una localización similar en el dominio yuxtamembrana para el corte del ectodominio de Nrx3 (Borcel et al., 2016).

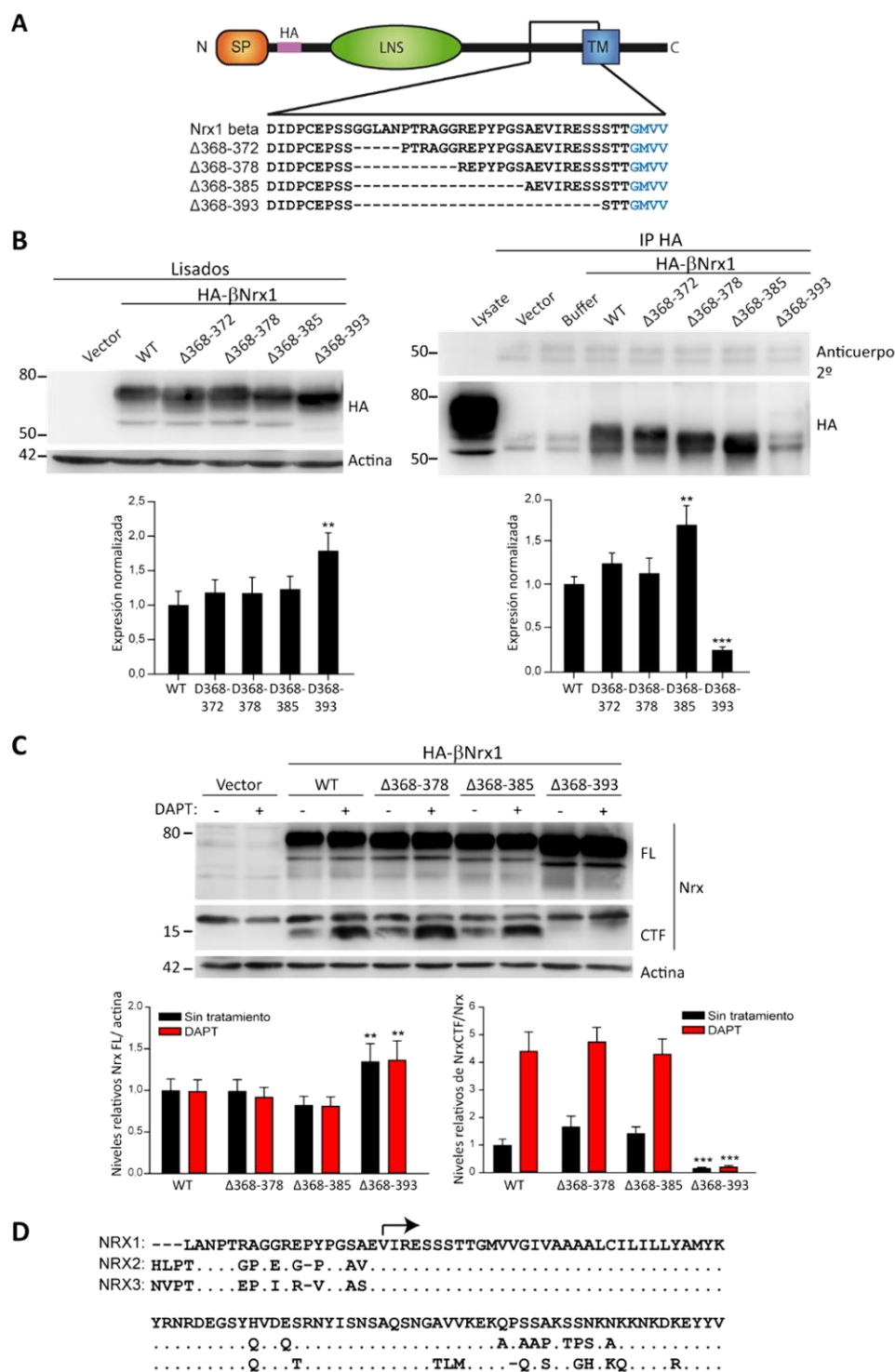
Una vez determinado el sitio de corte que produce NrxCTF, en el laboratorio se generó un vector de expresión HA-NrxCTF que codifica los 85 últimos residuos C-terminal de Nrx1 empezando en V388 (Figura 11D) y etiquetando el extremo N terminal con el epítipo HA. En paralelo, se generó la construcción HA-NrxCTF  $\Delta$ PDZ, un mutante de HA-NrxCTF en el que están ausentes los 3 últimos residuos C-terminal, esenciales para la interacción de Nrxs con las proteínas sinápticas de unión a dominios PDZ (Butz et al., 1998; Grootjans et al., 2000), como CASK (Figura 12A). HA-NrxCTF mostró una movilidad similar a la presentada por las bandas correspondientes a NrxCTF producidas por Nrxs endógenas o por la expresión exógena de  $\beta$ Nrx1 (Figura 12B,C). La menor movilidad de HA-NrxCTF respecto a NrxCTF endógena se debe probablemente a la incorporación de la etiqueta HA (Figura 12B,C). Estos datos demostraron que HA-NrxCTF es un sustrato de PS comparable a NrxCTF endógeno y nos ofrecieron una herramienta molecular para evaluar las consecuencias funcionales de simular el acúmulo selectivo de un único sustrato de PS, las Nrxs.

De forma notable, el acúmulo por sí solo de NrxCTF en terminales presinápticos recapitula la inhibición en la probabilidad de liberación y en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  provocados por la pérdida de función de PS (Servién-Morilla et al., 2018) (Figura 13). El efecto inhibitor de NrxCTF en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y la liberación de neurotransmisor requiere de la integridad del dominio citoplásmico, ya que el mutante que carece de los residuos que conforman el sitio de unión a dominios PDZ presenta un menor efecto (Figura 13).



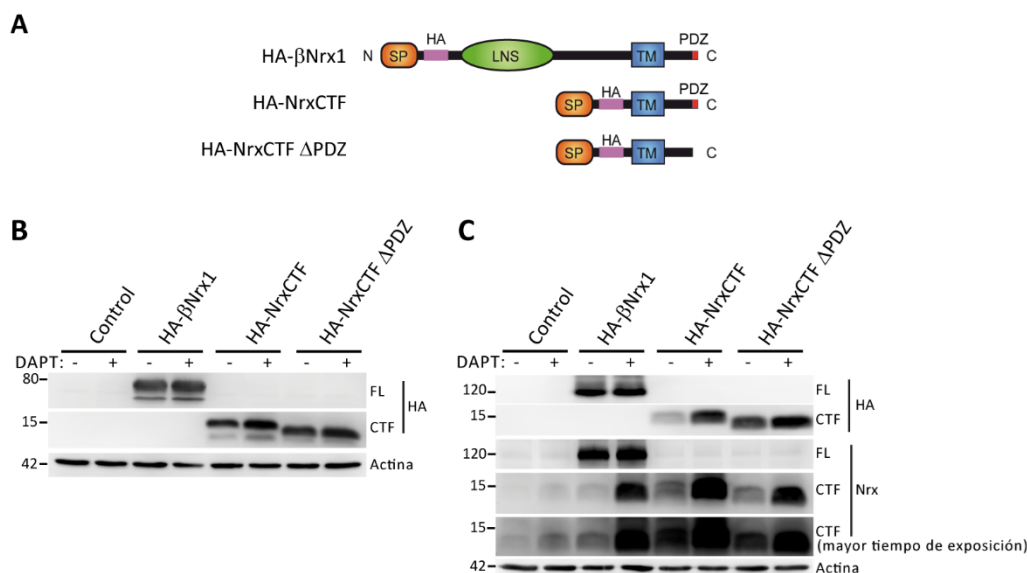


**Figura 10. Inhibición de la liberación presináptica en sinapsis de Nlgn1 en neuronas de ratón PS cDKO. A,** Diseño experimental. Neuronas de hipocampo fPS1/fPS1;PS2-/- fueron infectadas con lentivirus expresando sólo Synaptophysin-pHluorin (SynHy) o junto a Cre o ΔCre, seguido por la cotransfección de HA-Nlgn1 y DsRed. La misma población de axones forman punta sináptica en dendritas que expresan Nlgn1 (flechas negras) y que no expresan (flechas blancas), las cuales representan el control interno. **B,** Las imágenes muestran la fluorescencia de SynHy de cultivos de hipocampo expresando sólo SynHy (control) o junto a ΔCre o Cre (neuronas PS cDKO). La respuesta de SynHy fue provocada con 40 y 300 potenciales de acción (APs). **C-E,** Cinética (C, D) y amplitudes de pico (E) de la fluorescencia de SynHy normalizada en sinapsis internas (D) e inducida por Nlgn1 (C). Adaptado de Servián-Morilla, 2018.



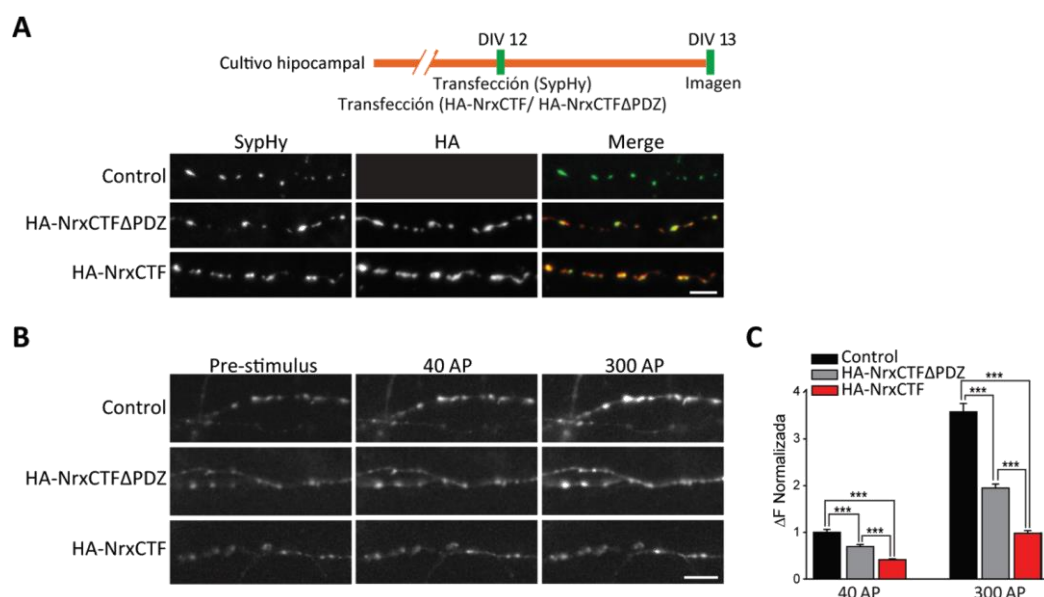
**Figura 11. Procesamiento proteolítico de mutantes de delección de Nr1-β.** **A**, Secuencias de mutantes de delección de la proteína con la región yuxtamembrana de humano Nr1β. SP: péptido señal, HA: epítipo HA, LNS: dominio de unión a laminina/neurexina/globulina de unión a hormonas sexuales, TM: dominio transmembrana. **B**, Experimentos de *Western blot* con anticuerpo anti-HA de lisados de células o inmunoprecipitados de HA de medio condicionado de células HEK293T transfectadas con la construcción indicada. Se incluyó un lisado de células transfectadas con HA-βNr1 para mostrar el peso más bajo de los ectodominios inmunoprecipitados, abajo, su cuantificación. **C**, Detección (Continúa pie de figura →)

(← Continúa pie de figura) de NrxCtf mediante experimentos de *Western blot* de células HEK293T transfectadas y usando un anticuerpo anti-Cyto-Nrx (Nrx). **D**, Secuencia de alineamiento de las proteínas NRX1-3 humanas. Muestran una alta conservación del sitio de escisión y NrxCtf. Los puntos indican aminoácidos idénticos. La flecha indica V388. Adaptado de Servián-Morilla et al., 2018.

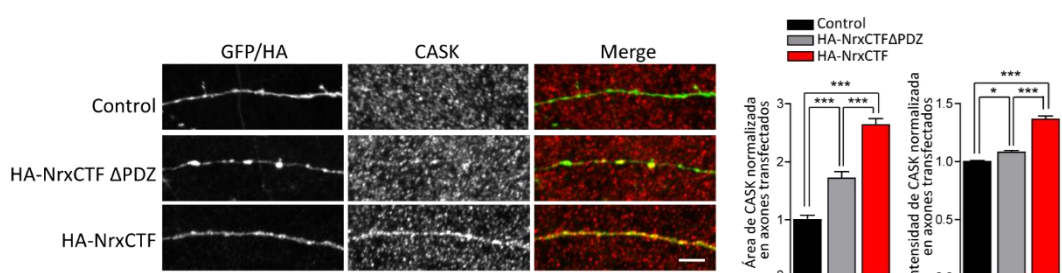


**Figura 12. Procesamiento de HA-NrxCTF por PS.** **A**, Esquema gráfico que muestra las construcciones HA-NrxCTF y HA-NrxCTF ΔPDZ comparadas con HA-βNrx1 (HA-Nrx1-β). **B**, *Western blot* de células HEK293T transfectadas en presencia de DAPT. **C**, Lisados de neuronas de hipocampo infectadas con HA-βNrx1, HA-NrxCTF y HA-NrxCTF ΔPDZ e incubados con DAPT. Se analizó con los anticuerpos anti-HA y anti-Cyto-Nrx (Nrx). Adaptada de Servián-Morilla et al., 2018.

HA-NrxCTF interacciona con CASK mediante el sitio de unión a dominios PDZ (Figura 14), sugiriendo que NrxCtf acumulada en terminales presinápticos puede asociarse y desplazar de los sitios de interacción natural componentes claves del terminal, afectando de esta manera a su función. Por tanto, estos datos indican que Nrxs es el sustrato concreto que media los defectos en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y liberación de neurotransmisor ocasionados por una falta de función de PS.



**Figura 13. La expresión de NrxCtf inhibe la liberación vesicular presináptica.** **A**, HA-NrxCTF o HA-NrxCTF ΔPDZ fueron cotransfectadas con SypHy en neuronas de hipocampo y marcadas con anticuerpo anti-HA. Terminales presinápticos que expresan SypHy fueron detectados con fluorescencia GFP. **B**, Las imágenes muestran la respuesta de Syphy a 40 y 300 APs en axones que expresan HA-NrxCTF y HA-NrxCTF ΔPDZ. A la derecha, Amplitudes de pico de la fluorescencia de SypHy en axones. Test estadístico: Kruskal-Wallis seguido de *post hoc* Dunn's test. *p*-value: \*\*\**p*<0.001. Adaptado de Servián et al., 2018.

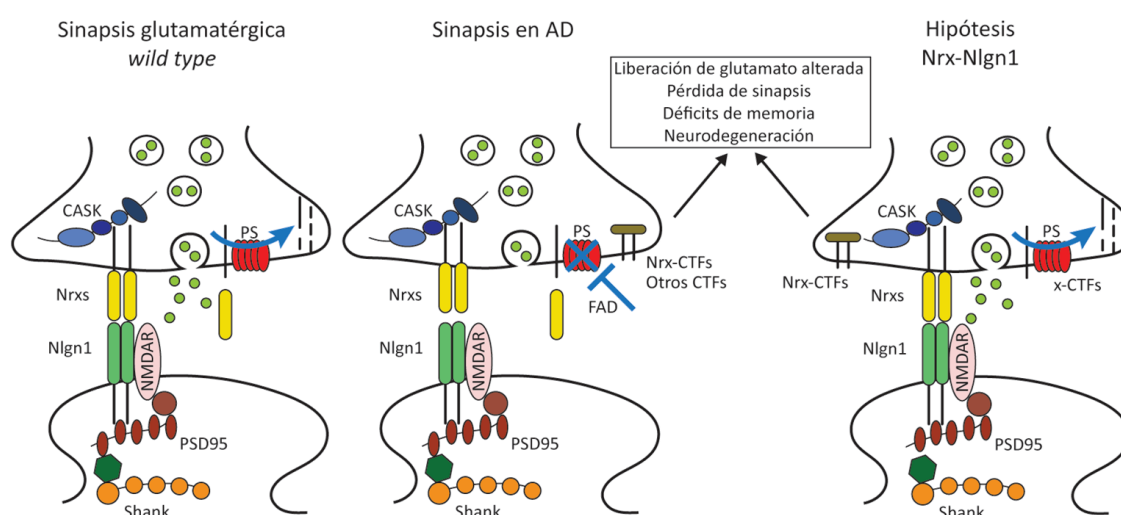


**Figura 14. Acúmulo de CASK en axones que expresan NrxCtf.** Experimentos de inmunofluorescencia con anticuerpos anti-HA y anti-CASK muestran acúmulo de CASK en axones que expresan HA-NrxCTF. A la derecha, cuantificación de CASK. Test estadístico: one-way ANOVA seguido de *post hoc* Bonferroni. *p*-value: \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001. Adaptado de Servián-Morilla et al., 2018.

## 4. Hipótesis de Neurexinas-Neuroliguina-1 en la enfermedad de Alzheimer

El conjunto de los datos obtenidos de nuestros estudios sugieren que el acúmulo de NrxCtf en los terminales presinápticos puede desencadenar déficits sinápticos, de memoria y neuronales asociados con la pérdida de función de PS en FAD (Figura 15). Nuestra propuesta sostiene que el acúmulo de NrxCtf podría afectar a los niveles y/o la función de los componentes del sistema de Nrxs-Nlgn1 en una fase temprana, explicando los defectos en plasticidad sináptica y de memoria observada en pacientes. El mantenimiento crónico de estos defectos resultaría en la pérdida de sinapsis y neurodegeneración característicos de las fases tardías de la enfermedad. Nuestra hipótesis se basa en los siguientes hallazgos experimentales comentados arriba y resumidos a continuación. Hemos demostrado que la pérdida de función de PS resulta en el acúmulo del sustrato NrxCtf en terminales presinápticos de neuronas y de ratones modelos de la AD (Saura et al., 2011). Este acúmulo de NrxCtf aparece en una fase temprana asintomática que coincide con defectos en la liberación de neurotransmisor, pero que precede a los defectos de memoria y de neurodegeneración típicos de las fases tardías sintomáticas (Saura et al., 2011). Además, hemos demostrado recientemente que el acúmulo por si solo de NrxCtf, sin alterar el procesamiento del resto de sustratos de PS, reproduce los defectos en liberación de neurotransmisor debidos a la falta de función de PS en neuronas de hipocampo en cultivo (Serván-Morilla et al., 2018). Mutaciones en PS1 que ocasionan FAD impiden el procesamiento proteolítico de Nrxs, resultando en el acúmulo de NrxCtf (Bot et al., 2011; Saura et al., 2011). La asociación genética de genes de *NRX* (Martínez-Mir et al., 2013) y la identificación de mutaciones de pérdida de función en *NLGN1* en pacientes de AD (Tristán-Clavijo et al., 2015) sugieren un papel de NrxCtf-Nlgn1 en pacientes. En conjunto, los datos del grupo sugieren que mutaciones en genes de *PS* causantes de FAD resultan en el acúmulo de NrxCtf en los terminales presinápticos de los pacientes. Dicho acúmulo podría ser la causa de los consiguientes defectos en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , liberación de neurotransmisor y LTP característicos de las fases tempranas de falta de función de PS. Nuestra hipótesis postula que el mantenimiento crónico de la acumulación de NrxCtf en terminales

presinápticos sería responsable de la aparición de los marcadores clínicos típicos de las fases tardías de AD, como defectos conductuales, de memoria y neurodegenerativos. Debido a la naturaleza trans-sináptica del complejo de Nrxs-Nlgn1, el acúmulo de NrxCtf podría afectar los niveles y/o función de Nlgn1 en la membrana opuesta y, como consecuencia, desencadenar fallos en la función postsináptica glutamatergica. En este sentido, se ha demostrado que los defectos presinápticos en la probabilidad de liberación ocasionados por una falta de función de PS preceden a los defectos postsinápticos en LTP y en la respuesta de receptores NMDA (Zhang et al., 2009). Por tanto, el acúmulo de NrxCtf es un buen candidato para desencadenar la cascada de eventos que conduce a síntomas típicos de AD. Una consecuencia de nuestra hipótesis es que la reducción del acúmulo de NrxCtf podría revertir, detener o retrasar la progresión hacia fases tardías de la enfermedad.



**Figura 15. Hipótesis de Nrxs-Nlgn1 en AD.** La pérdida de la actividad PS/γ-secretasa induce la acumulación temprana de sustratos de PS, entre ellos NrxCtf, coincidiendo con déficits en la liberación de glutamato y plasticidad sináptica. El acúmulo único de NrxCtf en los terminales presinápticos de las neuronas glutamatergicas con actividad PS normal, desencadena la ruta patogénica responsable de los signos distintivos de AD, como déficits de memoria, la pérdida de sinapsis y la neurodegeneración. NrxCtf puede interactuar potencialmente con ligandos sinápticos desconocidos (rectángulo marrón).

## II. OBJETIVOS

El objetivo general de esta Tesis Doctoral ha sido analizar los efectos asociados a AD causados por la falta de procesamiento de Neurexinas por Presenilinas. Los objetivos principales de esta Tesis Doctoral han sido:

1. Generación de ratones transgénicos de expresión constitutiva e inducible del sustrato de Presenilinas, NrxCtf, en el cerebro adulto.
2. Caracterización bioquímica y distribución celular de la expresión de NrxCtf en los modelos de ratón generados.
3. Caracterización fenotípica y análisis conductual asociado a AD en ratones de expresión de NrxCtf.
4. Detección de posibles mecanismos sinápticos afectados por el acúmulo de NrxCtf.



### III. MATERIALES Y MÉTODOS

# 1. Cultivo de células

## 1.1. Células N2a

### 1.1.1. Mantenimiento de la línea celular N2a

La línea celular N2a provienen de un neuroblastoma cerebral de ratón albino de la especie *Mus musculus*, derivadas de la cresta neural del ratón. Las células N2a tienen un crecimiento adherente y poseen una morfología neuronal y ameboidal. Se utilizaron en esta Tesis por su facilidad para ser transfectadas y sobreexpresar proteínas exógenas, además de por su amplio uso en la investigación de enfermedades neurodegenerativas como AD.

El mantenimiento de las células N2a se realizó en frascos de cultivo (Biofil) con medio de cultivo DMEM *high glucose* (Gibco) suplementado con un 5% de suero fetal bovino (FBS HyClone, Thermo Fisher Scientific), 2 mM glutamax (Gibco) y 100 U/ml penicilina + 100 µg/ml estreptomicina (Gibco). Las células se mantuvieron en un incubador en condiciones estables de 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

### 1.1.2. Transfección de células N2a

Las células N2a sembradas en placas de cultivo de 24 pocillos se transfectaron utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las células se mantuvieron en el incubador durante 24-48 horas para permitir la expresión de las proteínas exógenas. En el caso del uso del inhibidor químico DAPT (N-[N-(3,5-difluorofenacetil-L-alanil)]-S-phenilglicina t-butil éster, Sigma Aldrich), se trató a las células con 5µM del inhibidor durante las últimas 12 horas de expresión de la proteína exógena.

## 1.2. Cultivo primario de neuronas de hipocampo de rata

Los cultivos de neuronas de hipocampo se realizaron a partir de embriones E18 (18 días de gestación) de ratas gestantes Wistar provenientes del Servicio de Producción y Experimentación animal del IBIS. La rata gestante se sacrificó por inhalación de CO<sub>2</sub> y se extrajeron por cesárea los embriones. Los cerebros de los embriones se colocaron en una placa de 6cm de diámetro con DMEM suplementado (2 mM de Glutamax) sobre hielo. Bajo la lupa de disección, se extrajeron los hipocampos con unas pinzas de punta fina Dumont #5 (Fine Scientific Tools) y se distribuyeron en placas de 3.5 cm de diámetro que contenían 2 ml de DMEM suplementado. En la campana de flujo laminar se practicaron dos cortes con un escalpelo a cada hipocampo y se añadieron 220 µl de tripsina al 2.5% (Gibco), dejándola actuar en el incubador durante 30-40 minutos. Los hipocampos se disgregaron mecánicamente en un tubo con 2 ml de medio DB1 (DMEM suplementado con 10% suero fetal bovino, 44.4 mM D(+)-glucosa (Sigma), 2 mM Glutamax, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina), haciéndolos pasar 20 veces por pipetas Pasteur de vidrio con aperturas reducidas al 50 y 25% de su diámetro inicial. Las células disgregadas se contaron utilizando azul de Tripán en una cámara de Neubauer. Se sembraron 65000 células por pocillo de una placa de 24 pocillos que en el caso de usar cristales, era previamente tratada con poli-D-Lisina (0.5mg/ml) en ácido bórico 75 mM pH 8.2 filtrado. Las células se cultivaron en medio DB1 durante 2.5 horas en el incubador. Posteriormente, el medio de siembra se sustituyó con medio Neurobasal-B27 (Neurobasal [Gibco], B27 [Invitrogen], 2 mM Glutamax, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina) atemperado.

### 1.2.1. Transfección de cultivos primarios

Las neuronas sembradas en placas de cultivo de 24 pocillos se transfectaron utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las células se mantuvieron en el incubador durante 24-48 horas para permitir la expresión de las proteínas exógenas.

## 2. Generación de vectores de expresión de HA-NrxCTF

### 2.1. Generación del transgén CaMKII-HA-NrxCTF

Esta construcción se creó para generar un modelo transgénico de ratón constitutivo.

El transgén se generó a partir del vector pCDNA3 HA-NrxCTF, previamente producido en nuestro laboratorio (Servién-Morilla et al., 2018), siguiendo la siguiente estrategia de clonaje. El inserto HA-NrxCTF de 444 pb se liberó con digestión *HindIII* y *EcoRI* del vector pCDNA3 HA-NrxCTF y se clonó en el vector pNN265 (cedido por Dr. Ángel Barco, Instituto de Neurociencias de Alicante) en un sitio único *EcoRV* localizado en una posición 3'/5' de un intrón 3'/señal de poliadenilación de SV40. El vector pNN265 se digirió con *NotI* y se aisló el fragmento que contiene HA-NrxCTF y el intrón 3'/señal de poliadenilación. Este fragmento se insertó en un sitio *NotI* localizado 3' del promotor CaMKII en el vector pMM403 (11500 pb) (cedido por Dr. Ángel Barco, Instituto de Neurociencias de Alicante). Este plásmido contiene el promotor CaMKII (8500 pb), que será el que dirija la expresión de la proteína HA-NrxCTF. Para obtener el fragmento usado en la generación de ratones transgénicos, el vector pMM403-HA-NrxCTF se digirió con *SfiI* y se aisló el fragmento de 3500 pb que contiene el promotor CaMKII (7669 pb) y la secuencia codificante de HA-NrxCTF.

### 2.2. Generación del transgén TRE-HA-NrxCTF

Esta construcción se creó para generar un modelo transgénico de ratón constitutivo.

El transgén se generó a partir del vector pCDNA3 HA-NrxCTF, previamente producido en nuestro laboratorio (Servién-Morilla et al., 2018), siguiendo la siguiente estrategia de clonaje. Se amplificó la secuencia HA-NrxCTF de 452 pb por *PCR* con cebadores que contienen dianas para *NheI* y *BsiWI*. Este fragmento amplificado se incluye en pGEMT (Promega) y se liga con el plásmido LenLox Syn-Tet-off GFP (9143 pb)

(Gascón et al., 2008) que contiene el promotor inducible TRE y WPRE. De este plásmido eliminamos la secuencia correspondiente a GFP e incluimos en su lugar el inserto HA-NrxCTF con el uso de las enzimas *NheI* y *BsrGI*. Para obtener el fragmento usado en la generación de ratones transgénicos, el vector Syn-Tet-off-HA-NrxCTF se digirió con *AvrII* y *PvuI* y se aisló la secuencia objetivo que conforma el transgén y contiene el promotor TRE, WPRE y la secuencia codificante de HA-NrxCTF.

#### 2.3. Microinyección pronuclear

Los insertos TRE-HA-NrxCTF y CaMKII-HA-NrxCTF se insertaron en el genoma de ratones de la cepa FVB/N mediante microinyección pronuclear por el Servicio General de Producción y Experimentación Animal de la Universidad de Sevilla.

### 3. Aspectos generales del trabajo con un modelo animal

#### 3.1. Normativa del uso de animales de experimentación

Todos los procedimientos con animales de experimentación realizados en esta Tesis Doctoral siguieron la normativa marcada por el Real Decreto 53/2013 en el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y fueron llevados a cabo por personal cualificado. Los experimentos desarrollados se aprobaron por el Comité Ético para la Experimentación Animal de la Universidad de Sevilla.

La estabulación de animales se produjo en Centros de Experimentación Animal autorizados por la Consejería de Agricultura, Pesca y Medio Ambiente (ES410910008015 y ES410400008002). Los ratones se mantuvieron con una temperatura constante de  $22\pm1^{\circ}\text{C}$ , acceso ilimitado a comida y agua y en habitaciones con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas cada uno, de acuerdo a las directrices europeas (Directiva 2010/63/EU).

Los animales destinados a la extracción de muestras de tejido se sacrificaron mediante dislocación cervical. En los casos indicados, el sacrificio se realizó mediante anestesia letal de Tiobarbital (Braun) por inyección intraperitoneal.

#### 3.2. Población experimental del modelo animal CaMKII-HA-NrxCTF

El modelo animal de ratones CaMKII-HA-NrxCTF procede del cruce de ratones transgénicos CaMKII-HA-NrxCTF con animales *wild type*, todos de la cepa FVB/N. Como control para los experimentos se utilizaron ratones *wild type* hermanos de camada. La identificación de los ratones se realizó mediante marcaje en los dedos.

#### 3.3. Población experimental del modelo animal TRE-HA-NrxCTF; CaMKII-tTA

El modelo animal inducible procede del cruce de ratones simples transgénicos TRE-HA-NrxCTF de la cepa FVB/N con ratones simples transgénicos CaMKII-tTA de la cepa C57BL/6J, generados estos últimos por Mayford et al. (1996) y cedidos a nuestro laboratorio por el Dr. Ángel Barco (Instituto de Neurociencias de Alicante). Estos ratones se cruzaron entre sí para obtener poblaciones de ratones dobles transgénicos TRE-HA-NrxCTF; CaMKII-tTA de la estirpe B6FVBF2/J. Como control se utilizaron ratones *wild type*, simples transgénicos TRE-HA-NrxCTF y simples transgénicos CaMKII-tTA hermanos de camada. La identificación de los ratones se realizó colocando micro-etiquetas codificadas en la oreja.

#### 3.4. Extracción de DNA y genotipado de ratones

El genotipado de los ratones se realizó mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR, en sus siglas en inglés). Muestras de 1-2 mm del extremo de la cola o procedentes del marcaje en dedos, se incubaron durante 45 minutos a 95°C en 75 µl de solución A (25 mM NaOH, 0.2 mM EDTA) y, posteriormente, se neutralizaron con 75 µl de solución B (40 mM Tris-HCl, pH 5.5). Para la reacción de PCR se utilizaron

50 ng de DNA, la polimerasa GoTaq Flexi (Promega), nucleótidos (Promega) y las parejas de oligonucleótidos indicados en la Tabla 1. La reacción de PCR se realizó en el termociclador Veriti 96 well Thermal Cycler (Applied Biosystems), utilizando el siguiente programa: 3 minutos de desnaturalización a 94°C, 35 ciclos de desnaturalización (45 segundos a 94°C), hibridación (45 segundos a 58°C) y extensión (45 segundos a 72°C), con 7 minutos finales a 72°C. El producto resultante se migró en un gel al 1% de agarosa (Pronadisa) disuelta en TAE (40 mM Tris pH 7.6, 20mM ácido acético, 1 mM EDTA) teñido con 0.002% SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen), mediante electroforesis en el equipo Mupid-one (Takara).

Fragmento amplificado	Oligonucleótido directo	Oligonucleótido reverso
<b>Control positivo</b>	5'-GCTGGAAACGATCACATACCG-3'	5'-AGCTCCTGATGATCCAATGG-3'
<b>CaMKII-HA-NrxCTF 1</b>	5'-GGTTCTCCGTTTGCACTCAG-3'	5'-CCCGGTTTCTGTACTTGTAC-3'
<b>CaMKII-HA-NrxCTF 2</b>	5'-GTACAAGTACAGAAACCGGG-3'	5'-CACACCACAGAAGTAAGGTTCC-3'
<b>TRE-HA-NrxCTF 1</b>	5'-ATCCACGCTGTTTTGACCTC-3'	5'-CCCGGTTTCTGTACTTGTAC-3'
<b>TRE-HA-NrxCTF 2</b>	5'-GTACAAGTACAGAAACCGGG-3'	5'-GAGACAGCAACCAGGATTTA-3'
<b>CaMKII-tTA</b>	5'-CCTCGCAGACAGCGAATTC-3'	5'-TTGTGGACTAAGTTTGTTC-3'

**Tabla 1.** Secuencias de las parejas de oligonucleótidos utilizadas para el genotipado de los ratones CaMKII-HA-NrxCTF, TRE-HA-NrxCTF y dobles transgénicos por PCR.

## 4. Técnicas bioquímicas para el análisis de proteínas

### 4.1. Análisis de proteínas mediante *Western blot*

#### 4.1.1. Obtención de lisados a partir de tejido

Los ratones se sacrificaron mediante dislocación cervical. Se separa la calota craneal para extraer el cerebro con una espátula. El tejido se introdujo en una placa de 6 cm de diámetro con tampón fosfato salino frío (PBS, por sus siglas en inglés) sobre hielo para inhibir la degradación del tejido. Bajo lupa se localizaron las estructuras

cerebrales de interés y se diseccionaron en el menor tiempo posible con pinzas de punta fina Dumont #5 (Fine Scientific Tools). El tejido diseccionado se guardó en tubos de microcentrífuga Eppendorf y se procesó inmediatamente o se congeló por inmersión en nitrógeno líquido. Las proteínas se extrajeron con buffer de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, Tritón X-100 1%, SDS 0.1%) suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas (*Complete Mini EDTA-free tablets*, Roche). El volumen de buffer utilizado dependió de la estructura a lisar. Se realizó una disgregación mecánica del tejido utilizando un pistilo acoplado a un homogeneizador portátil a motor (VWR). Posteriormente, las muestras se homogeneizaron mediante 5-10 pases por una jeringa de insulina de 27G (BD). Los restos insolubles se descartaron mediante la centrifugación del lisado a 13000 rpm durante 10 minutos a 4°C.

#### 4.1.2. Obtención de lisados a partir de cultivos celulares

Las células sembradas en los pocillos se lavaron con PBS frío y tras retirarlo completamente se añadieron 100 µl de *buffer* de lisis (Tris-HCl 50mM pH7.4, NaCl 100mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM, Tritón X-100 1%, SDS 0.1%) suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas. Tras 10 minutos en hielo, las muestras se homogeneizaron pasándolas 5-10 veces con una jeringa de insulina de 27G. Los restos insolubles se descartaron mediante la centrifugación del lisado a 13000rpm durante 10 minutos a 4°C.

#### 4.1.3. Electroforesis de geles SDS-poliacrilamida y transferencia de proteínas

Las muestras a analizar se equilibraron por concentración proteica total, cuantificada mediante el kit BCA (Thermo Fisher Scientific). El volumen de muestra necesario para obtener la cantidad de proteína requerida se diluyó en buffer de carga (concentración final: 180 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 0.005% azul de bromofenol) y se añadió β-mercaptoetanol (BioRad) hasta una concentración final del 4% (568 mM). Las muestras se calentaron a 95°C durante 5 minutos para favorecer la desnaturalización de las proteínas.

Los geles de SDS-Bis-Acrilamida para la separación de las proteínas se prepararon con un grosor de 1.5 mm y 10 carriles. Se usaron mezclas de acrilamida:bis-acrilamida



de 37.5:1 (BioRad) y 32:1 (Applichem). En la parte superior del gel se situó la solución apiladora (4% de acrilamida) y en la inferior la solución separadora (6-14% de acrilamida, según el peso molecular de las proteínas a testar). La electroforesis se realizó utilizando el sistema mini-Protean (Biorad) con buffer Tris-Glicina-SDS (25 mM tris, 192 mM glicina, 0.1% SDS) en el caso de la solución del ratio 37.5:1, con buffer Tris-Tricina-SDS (100 mM tricina, 0.1% SDS, pH 8.4) para el ratio 32:1. Las muestras preparadas y el marcador de peso molecular (bioBlu, gTPbio) se cargaron en los pocillos del gel y se aplicó una corriente constante de 100 V. Las proteínas separadas se transfirieron por transferencia húmeda (25 mM Tris, 192 mM Glicina, 20% metanol) a una membrana PVDF de 0.45 µm (Millipore) previamente activada con metanol puro, mediante la aplicación de una corriente de 300 mA durante 90 minutos.

#### 4.1.4. Inmunodetección de proteínas en la membrana

Para bloquear las uniones inespecíficas, se realizó una incubación durante 1 hora con 5% leche desnatada deshidratada en buffer Tris Salino-Tween (TBS-T) (137 mM NaCl, 20 mM Tris, 1% Tween, pH 7.4). Posteriormente, se incubó la membrana con el anticuerpo primario correspondiente diluido en solución de bloqueo (Apartado 8 de Materiales y Métodos) durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C, siempre en agitación. Tras realizar 3 lavados de 10 minutos con TBS-T, la membrana se incubó durante una hora con el anticuerpo secundario acoplado a la enzima peroxidasa HRP (Jackson Immunoresearch) (Apartado 8 de Materiales y Métodos) diluido 1:5000 en solución de bloqueo y, posteriormente, se lavó 3 veces durante 10 minutos.

#### 4.1.5. Revelado, toma de imágenes y cuantificación

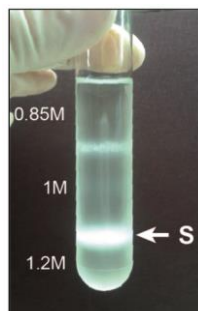
La membrana se incubó con los reactivos Clarity (BioRad) o Supersignal-Femto (Thermo Fisher Scientific) durante 3-5 minutos y se detectó la quimioluminiscencia emitida utilizando el transiluminador IQ-LAS4000-mini Gold (GeneralElectrics). Se tomaron imágenes digitales seriadas con quimioluminiscencia acumulada cada 10 segundos hasta la saturación de la señal. Para cuantificar las imágenes obtenidas se usó el *software* Quantity-One (BioRad). Para ello, se seleccionaron tres imágenes no

saturadas con tiempo de exposición en incremento y se trazó un rectángulo del área de una banda a analizar. Esta área se clonó sobre las demás bandas de la imagen y sobre una región correspondiente a la señal inespecífica. Se cuantificó la suma de la intensidad de los píxeles dentro de cada área ajustada al fondo inespecífico. Este proceso se repitió para las exposiciones seleccionadas, clonando la disposición de las áreas de cuantificación y tomando como valor para hacer la estadística el promedio del valor de las tres imágenes seleccionadas.

#### 4.2. Fraccionamiento subcelular de sinaptosomas

Las muestras se mantuvieron en frío durante todo el proceso de la purificación. La región de interés (corteza, hipocampo, estriado) de 2-3 animales del mismo genotipo se homogeneizaron en 10 ml de buffer A (5 mM HEPES pH 7.4, 0.32 M sacarosa, 1 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>) suplementado con inhibidores de proteasas (Complete Mini EDTA-free tablets, Roche) y utilizando un homogeneizador de émbolo. Se reservó un 5% del volumen como lisado (fracción L). Tras centrifugar las muestras a 1400 g durante 10 minutos, se reservó el sobrenadante y se homogeneizó de nuevo el pellet con 4 ml de buffer A. El material homogeneizado se centrifugó a 710 g durante 10 minutos, se descartó el pellet y el sobrenadante se combinó con el volumen del paso anterior. La mezcla se centrifugó en un tubo de pared fina Ultra Clear de 17 ml (Beckman Coulter) durante 10 minutos a 13800 g en el rotor Sw32.1 Ti de la ultracentrífuga Optima L-100 XP (Beckman Coulter). Se guardó un 5% como sobrenadante (fracción SN) y se descartó el resto de la solución. El pellet se resuspendió en 3 ml de solución B (6 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.32 M sacarosa, 1 mM NaHCO<sub>3</sub>) suplementado con inhibidores de proteasas utilizando un homogeneizador de émbolo y, constituyendo la fase de membrana (fracción M). Se preparó un gradiente discontinuo de sacarosa en un tubo de pared fina Ultra Clear de 17 ml (Beckman Coulter), con concentraciones decrecientes de sacarosa (1.2M, 1 M y 0.85 M de sacarosa), sobre el que se vertió el homogeneizado obtenido en el paso previo. Se centrifugó a 82500g durante 2 horas en la ultracentrífuga. Se aspiró la banda correspondiente a los sinaptosomas entre las fases 1 y 1.2 M con un pipeteador automático acoplado a una pipeta pasteur de vidrio (Figura 16). Se guardó el 75% del volumen recuperado como fracción de sinaptosomas (fracción S). El 25%

restante se diluyó 1:1 en la solución C (12 mM Tris-HCl pH 8.0, 1% Tritón X-100) suplementado con inhibidores de proteasas, con la que se incubó durante 15 minutos para lisar los sinaptosomas. Las muestras se ultracentrifugaron a 32800g durante 1 hora. El sobrenadante obtenido supone la fracción presináptica (fracción Pre), mientras que el pellet, insoluble en Tritón X-100, se resuspendió mediante sonicación en buffer D (12 mM Tris-HCl pH 8.0, 1% NP-40) suplementado con inhibidores de proteasas, constituyendo la fracción postsináptica (fracción Post).



**Figura 16. Gradiente discontinuo de sacarosa en el que se indica la fracción de sinaptosomas purificada (S).**

## 5. Técnicas para el análisis histológico

### 5.1. Perfusión transcardíaca y seccionado del tejido

Los animales se anestesiaron con una dosis letal de Tiobarbital (Braun) mediante inyección intraperitoneal. Cuando alcanzaron una anestesia profunda, se realizó una perfusión transcardial con 50 ml de PBS y 50 ml de solución de fijación PFA (4% paraformaldehído en PBS, pH 7.4). El cerebro se extrajo y post-fijó mediante inmersión en solución PFA a 4°C durante una noche.

En el caso de la inclusión en bloques de OCT, el cerebro fijado se deshidrató por inmersión en una solución del 30% de sacarosa en PBS durante 48-72 horas a 4°C. Posteriormente, se incluyó el cerebro en OCT líquido (Tissue-Tek, VWR) y se congeló sobre nieve carbónica. Los bloques se cortaron a 20 µm en criostato (Leica) y se mantuvieron hasta su uso en el congelador a -20°C incluidos en solución crioprotectora

(30% etilenglicol, 10% PBS 10X, 30% glicerol). En el caso de la inclusión en gelatina, el cerebro se mantuvo tras la extracción en etanol 70% hasta su procesamiento en el vibratomo haciendo secciones de 20  $\mu$ m) y se mantuvieron a 4°C en PBS hasta su uso.

## 5.2. Inmunohistoquímica

Primero, se realizó el desenmascaramiento antigénico por calor con solución de citrato sódico (10 mM citrato sódico, pH 6) a 80°C en un baño (TW 2.03, ELMI, cedido por el laboratorio del Dr. David Cano, Instituto de Biomedicina de Sevilla. El bloqueo de la actividad de la peroxidasa endógena se realizó incubando los cortes de tejido con 0.006% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 0.02% metanol en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras 3 lavados de 5 minutos con PBS, se aplicó una solución de permeabilización-bloqueo (0.3% tritón X-100, 5% suero de cabra en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo primario anti-HA se diluyó en solución de bloqueo (0.1% tritón X-100, 5% suero de cabra, 1% BSA en PBS) y se incubó a 4°C durante toda la noche. Tras 3 lavados de 10 minutos con PBS, el tejido se incubó con el anticuerpo secundario biotinilado diluido en PBS-T (0.1% Tritón-X100 en PBS) durante 2 horas a temperatura ambiente (Apartado 6 Materiales y Métodos). Se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS y el tejido se incubó 1 hora con avidina/biotina-HRP mediante el kit de tinción peroxidasa ABC (Vectastain). Se lavó 2 veces durante 15 minutos con PB 0.1 M pH 7.5 (81 mM HNa<sub>2</sub>O<sub>4</sub>P, 19 mM H<sub>2</sub>NaO<sub>4</sub>P) y se aplicó el sustrato diaminobenzidina (DAB) con potenciación de níquel (1% DAB, 0.05% sulfato amónico de níquel, 0.033% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en PB 0.1M pH7.5). Los tiempos de revelado fueron establecidos para cada anticuerpo en base al fondo y la señal de cada uno. Por último, las muestras se deshidrataron en una cadena de etanol (50-100%) y xilol, y se montaron con medio de montaje DPX (Merck).

## 5.3. Fluorescencia de tejido

Los cortes de tejido se incubaron directamente con DAPI durante 15 minutos a una dilución de 1:1000 y a temperatura ambiente. Tras 3 lavados con PBS, las preparaciones se montaron con medio de montaje acuoso, Fluoromont-G (Southern Biotech).

#### 5.4. Tinción de Nissl

Para esta tinción se usó azul de toluidina (2g/L) en alcohol 70%. Cortes de tejidos montados en portaobjetos Superfrost Plus se dejan secar durante 12-14 horas. Los cortes se someten a deshidratación mediante una cadena ascendente de alcoholes (50% - 70% - 96% - 100%) y xilol, seguida de la hidratación del tejido mediante una cadena descendente de alcoholes (100% - 96% - 70% - 50%) y agua. La tinción con azul de toluidina se realiza durante 1.5 minutos. Los cortes teñidos se incuban con una nueva secuencia ascendente de alcoholes (50% - 70% - 96% - 100%) y xilol, y finalmente, se montan con medio de montaje DPX. En la adquisición y análisis de imágenes colaboraron Ana Santos, estudiante de grado, y Celia Cuevas, miembro actual del laboratorio.

#### 5.5. Toma de imágenes y cuantificación

Para la adquisición de imágenes de inmunohistoquímica se usó el microscopio BX-61 (Olympus) con objetivos de 40x a 100x, dispuesto por el Servicio de Microscopía del Instituto de Biomedicina de Sevilla. Para la adquisición de superimágenes se empleó el microscopio BX-61 NewCAST (Olympus) con objetivos de 2 a 10x. Todas las imágenes se analizaron y cuantificaron con ayuda del software ImageJ, desarrollado por el National Institute of Health (NIH).

### 6. Inmunofluorescencia de células de cultivo

Las células crecidas sobre cubreobjetos se fijan empleando una solución de tampón fosfato 0.1 M pH 7.4 con 4% paraformaldehído y 4% glucosa. Seguidamente, se realizan 3 lavados con PBS. Las muestras se permeabilizan y bloquean con PBS con 5% de suero de cabra y 0.05% Tritón X-100 durante 1 hora. Tras el bloqueo, las células se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpos primarios diluidos en la misma solución de bloqueo (Apartado 8 Materiales y Métodos). Pasado este periodo de incubación se realizan tres lavados con PBS y se incuban las muestras durante 1 hora

con anticuerpos secundarios diluidos en solución de bloqueo (Apartado 8 de Materiales y Métodos). Finalmente, las muestras se lavan 3 veces durante 5 minutos y se procede al montaje de los cubreobjetos en portaobjetos empleando Fluoromount-G (SouthernBiotech). Las muestras se conservan en frío protegidas de la acción directa de la luz. Para la adquisición de imágenes se usó el microscopio Axio A1 Observer (Zeiss) con objetivos de 40x a 63x.

## 7. Experimentos de comportamiento en líneas de ratón

### 7.1. Cohorte de animales

Para evitar variaciones que pudieran afectar a los ensayos de comportamiento, 3-5 días previos al comienzo de las pruebas, los ratones se estabularon individualmente o por parejas en una jaula con serrín limpio, que no se cambió hasta la finalización de la tanda de experimentos. Para disminuir el estrés por el manejo, el experimentador que realizó las pruebas manipuló los ratones en la sala de comportamiento durante 2-3 días antes de las pruebas comportamentales evitando el uso de perfume y de ruidos que pudieran alterar el comportamiento del animal y, por tanto, los resultados. Los ratones se trasladaron a la sala de comportamiento un mínimo de 30 minutos antes del inicio de las pruebas de comportamiento, que se realizaron en la fase de luz y en la franja horaria entre las ocho de la mañana y las cuatro de la tarde. El grupo control estuvo formado por ratones wild type y por ratones simples transgénicos TRE-HA-NrxCTF y CaMKII-tTA, y el grupo de estudio por ratones dobles transgénicos TRE-HA-NrxCTF; CaMKII-tTA. Para la realización de una serie de experimentos los animales se alimentaron con dieta con doxiciclina (Dox) (0.04g/kg, Safe Augy-Panlab) desde el establecimiento del cruce hasta 30 días después del nacimiento de la camada. En los tratamientos con Dox, en la etapa adulta, la dieta con pienso habitual se sustituyó por la misma dieta Dox. Parte de estos experimentos se realizaron en el Centro de Producción y Experimentación Animal de Sevilla por Francisco Javier Martín, miembro del centro y encargado del fenotipaje en el mismo. El resto de experimentos se realizaron en el Animalario del IBiS por la autora de

esta Tesis Doctoral y por Celia Martín Cuevas, miembro del mismo grupo de investigación.

## 7.2. Análisis SHIRPA

Previo a la realización de experimentos de comportamiento, las poblaciones de ratones se testaron con la batería de test primarios SHIRPA (SmithKline Beecham, Harwell, Imperial College and Royal London Hospital phenotype assessment) (Rogers et al., 1997) recogidas en la tabla 2.

Reflejo analizado	Observación o procedimiento
Posición corporal y actividades espontáneas	Temblor, espasmos, saltos
Reflejo de enderezamiento	Capacidad de girarse para apoyarse sobre las patas tras colocarle en decúbito prono
Reflejo postural	Suspensión de la cola
Reflejos faciales	Estimulación táctil de la oreja, bigotes y párpado para evaluar la retirada de oreja y bigotes o el cierre del ojo
Fuerza de garras y extremidades	Capacidad de agarrarse a una reja horizontal cuando es volteada para dejarlos boca arriba durante un minuto
Capacidad de visión	Alargamiento de las extremidades anteriores cuando se acerca a una superficie suspendido por la cola
Reflejo auricular o de sobresalto auditivo	Sobresalto que es producido por un ruido seco y fuerte

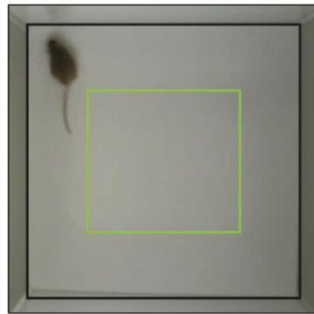
**Tabla 2. Pruebas de evaluación de la batería SHIRPA utilizadas.**

## 7.3. Evaluación de la locomoción exploratoria

### 7.3.1. Test de campo abierto

La prueba de campo abierto se realizó en un cuadrado de metacrilato gris de 45 x 45 cm con paredes opacas del mismo color (Harvard Apparatus). El test consistió en permitir al ratón explorar libremente el espacio durante 15 minutos mientras se grabaron sus movimientos desde el plano superior con una cámara. La zona central del campo se delimitó como un área de 25 x 25 cm (Figura 17). La detección automática del

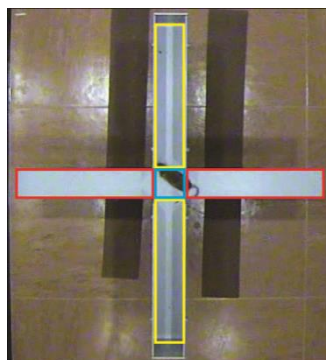
ratón, distancia total recorrida y la velocidad se analizaron con el programa Viewer 3 (Biobserve).



**Figura 17. Test de campo abierto.** Vista superior del test de campo abierto. En color verde se representa la zona central de 25 x 25 cm delimitada por el experimentador.

### 7.3.2. Laberinto elevado en cruz

El aparato en el que se realizó este test es un laberinto en cruz elevados sobre el suelo formado por dos brazos abiertos y dos brazos cerrados de 29.5 cm x 6 cm cada uno. Los brazos cerrados cuentan con paredes laterales de 15 cm de altura (Harvard Apparatus) (Figura 18). La estructura está realizada en metacrilato y aluminio. Al ratón se le permite explorar libremente el espacio durante 5 minutos mientras se graban sus movimientos con una cámara colocada por encima del test. La detección automática del ratón, la distancia total recorrida, la velocidad y el tiempo de estancia en cada compartimento se analizó con el programa SMART 3.0 (Harvard Apparatus).

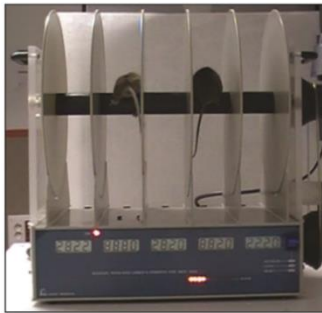


**Figura 18. Laberinto elevado en cruz.** Vista aérea del test. En rojo, se marca el área de cuantificación considerada como brazos abiertos; en amarillo, la zona de brazos cerrados. En azul se marca la zona central.



#### 7.4. Evaluación del aprendizaje motor: *Rotarod*

El aparato en el que se realiza el test consta de un eje cilíndrico motorizado y giratorio el cual puede girar a una velocidad creciente constante (Figura 19). El día previo al test, los ratones tuvieron dos sesiones de entrenamiento separadas por una hora en un aparato *Rotarod* acelerado (Ugo Basile 7650) (cedido por el Dr. Juan José Toledo Aral, Instituto de Biomedicina de Sevilla) con velocidad incrementada desde 4 a 40 rpm por un tiempo máximo de 5 minutos. En días consecutivos se realizaron tres ensayos diarios de las mismas características con un espacio entre ensayos de 45 minutos. La latencia de caída de cada día se analizó como el promedio o la mejor medida de las tres sesiones diarias.



**Figura 19. Aparato de *Rotarod*.** Fotografía frontal del test durante una sesión de comportamiento.

#### 7.5. Test de acicalamiento o *self-grooming*

El ratón a evaluar se habituó durante 10 minutos a una jaula vacía, limpia y con la tapa sin rejilla para evitar que el animal se suba a ésta (Figura 20). Durante los siguientes 10 minutos se grabó y se cuantificó manualmente el tiempo de acicalamiento y el número de eventos realizados en ese tiempo. Un evento se definió como la secuencia estereotipada de acicalamiento que comienza en las patas delanteras, continúa por el cuerpo y acaba en la cola. El tiempo mínimo de un evento de acicalamiento para que se considerara como tal se estableció en dos segundos.

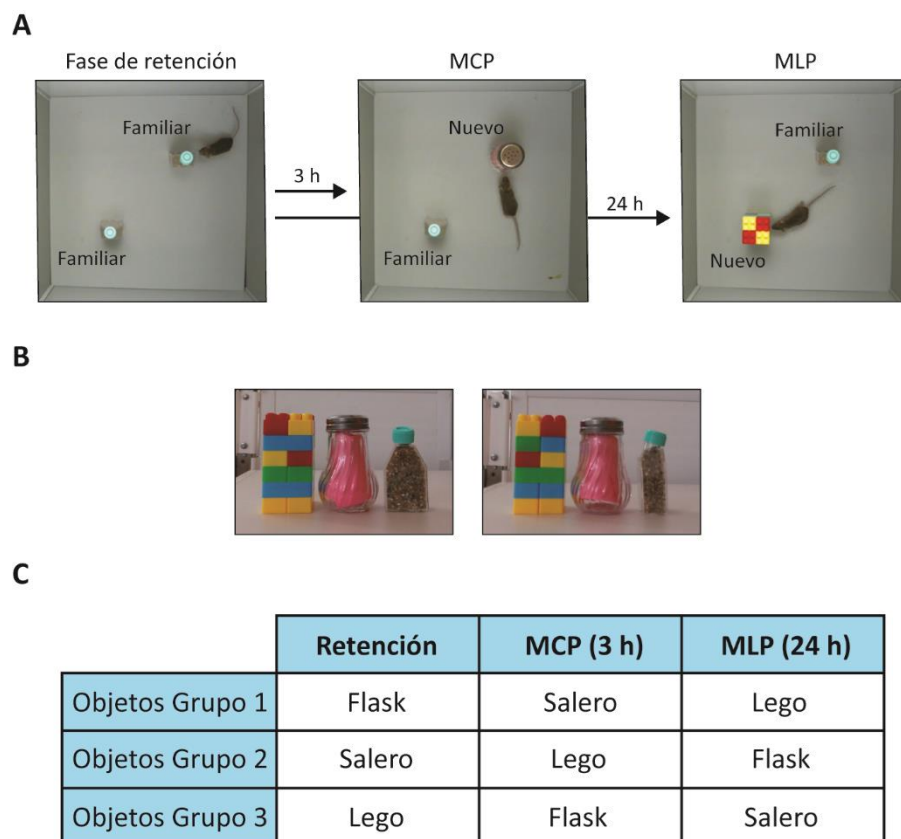


**Figura 20. Sesión de *self-grooming*.** Fotografía frontal del test durante una sesión.

## 7.6. Evaluación la memoria

### 7.6.1. Reconocimiento de un nuevo objeto

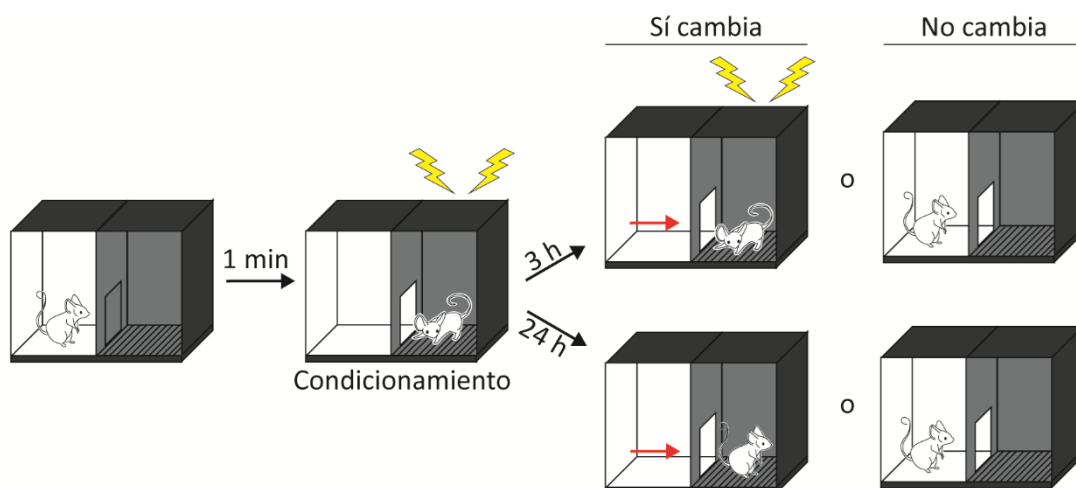
En la caja del test de campo abierto se colocan dos objetos idénticos adheridos a la base y distanciados a la misma distancia entre ellos y de las paredes. Para cada ratón se permite un tiempo de exploración libre de 10 minutos. A las 3 horas, uno de los objetos idénticos se reemplaza por otro nuevo de diferente forma, textura y color, permitiendo al ratón explorar el espacio durante 10 minutos. A las 24 horas, el objeto nuevo se reemplaza por otro distinto y se permite la exploración del ratón del mismo modo (Figura 21A,B). La adjudicación de objeto familiar o nuevo de los objetos seleccionados se aleatorizó en grupos de 3-4 ratones de cada población (Figura 21C).



**Figura 21. Test de reconocimiento de objetos.** **A**, Fotografía durante las diferentes etapas del test. **B**, Objetos utilizados durante el test. **C**, Objetos usados en cada fase del test. Cada serie comprende el mismo número de ratones control como de ratones dobles transgénicos.

### 7.6.2. Evitación pasiva

La caja está formada por dos compartimentos de plexiglás, uno iluminado y de paredes blancas y otro oscuro. Ambos compartimentos están conectados por una puerta mecánica cuya apertura se puede controlar de forma remota. El suelo del compartimento oscuro contiene una rejilla conectada a un administrador de descargas. Este test consta de tres fases, una de condicionamiento y dos de test para evaluar memoria a corto (MCP) y largo plazo (MLP) (Figura 22). En la fase de condicionamiento, se introduce al animal en el compartimento iluminado y con la puerta de acceso al compartimento oscuro cerrada. Pasado un minuto, se abre la puerta comunicante entre los dos compartimentos. Cuando el animal cambia de compartimento y entra en la habitación oscura recibe un choque eléctrico de 0.2 mA. A las 3 horas (MCP), se coloca al ratón en el compartimento iluminado con la puerta comunicante abierta durante un máximo de 300 s o hasta que el ratón cambie de compartimento. Al cambiar de compartimento, recibe un choque eléctrico. A las 24 horas (MLP) desde el condicionamiento, se repitió el test de la misma forma a como se hizo para MCP, pero sin aplicar el choque eléctrico al cambiar de compartimento. En el caso de que un ratón o cambie de comportamiento durante el tiempo de análisis, se le asigna el valor máximo de 300 segundos.



**Figura 22. Test de evitación pasiva.** Esquema del protocolo realizado en nuestras poblaciones de animales.

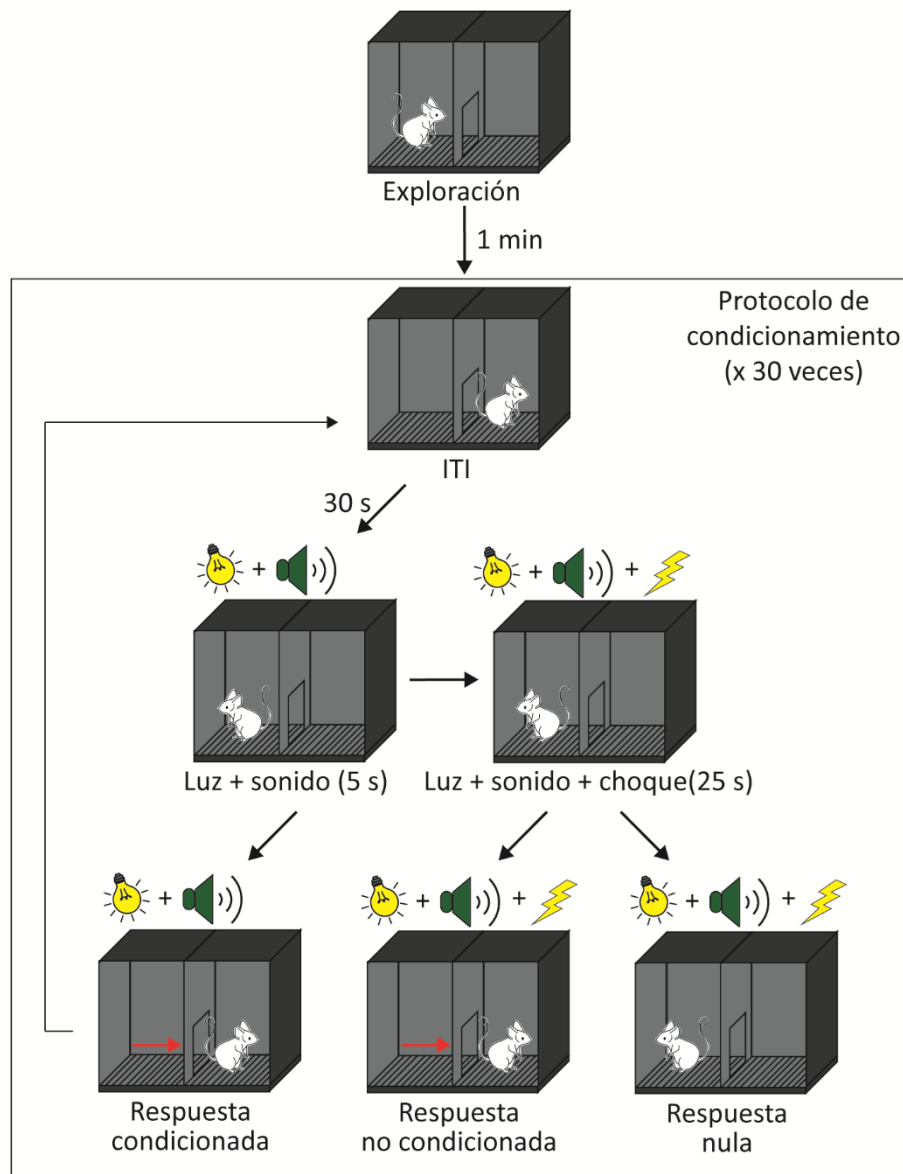
### 7.6.3. Evitación activa

El test consta de dos compartimentos de las mismas características que el descrito en el apartado 7.6.2., pero con la salvedad de que ambas habitaciones se presentan con paredes negras e iluminación ambiente. Tras un minuto de exploración libre por el aparato con la puerta comunicante abierta, el ratón se expone a 30 presentaciones de un estímulo luminoso y sonoro de 70 dB y 3000 Hz de 5 segundos. Si el ratón no cambia de compartimento en este tiempo, recibe una descarga eléctrica de 0.2 mA durante 25 segundos o hasta que se produzca el cambio de compartimento. El intervalo entre presentaciones es de 30 segundos y la prueba se realiza diariamente durante 5 días consecutivos. Se considera respuesta condicionada cuando el animal cambia de compartimento antes de recibir la descarga eléctrica, respuesta no condicionada cuando el animal cambia de compartimento tras recibir la descarga y respuesta nula cuando el animal no cambia de compartimento incluso después de recibir la descarga eléctrica (Figura 23).

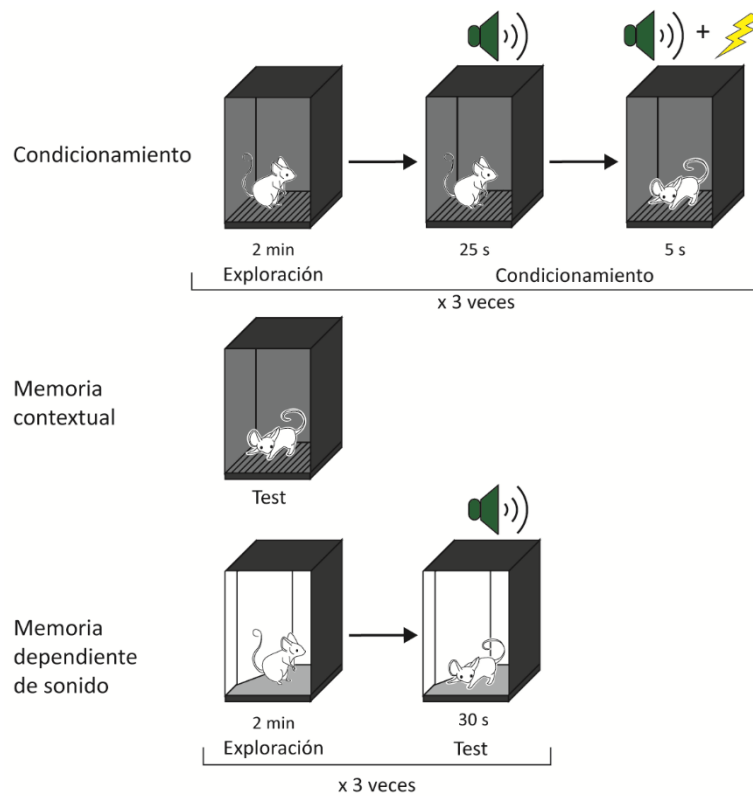
### 7.6.4. Condicionamiento al miedo

Para la realización de este test se adaptó el aparato usado en evitación pasiva y activa (apartados 7.6.2 y 7.6.3 de Materiales y métodos). Para ello se colocó una cámara en un ángulo en el que fuese visible todo el cubículo y que permitiera la cuantificación del test. El encargado de adaptar el test fue Francisco Martín, encargado del Servicio de Fenotipaje del Centro de Producción y Experimentación Animal de la Universidad de Sevilla. Este test consta de tres fases (Figura 24). En una primera fase de condicionamiento se coloca al animal en la habitación durante dos minutos y se presenta un estímulo sonoro de 30 segundos, acompañado en los últimos 5 segundos de un descarga eléctrica de 0.2 mA. Este protocolo se repite tres veces. A las 24 horas, se coloca al ratón en la misma habitación por espacio de 5 minutos. Seguidamente, se extrae al ratón y se cambia el color de las paredes y la forma de la habitación empleando distintos paneles. Se re-introduce al ratón en la habitación y se presentan los tres estímulos sonoros, sin descarga eléctrica, de la fase de condicionamiento. El tiempo de freezing se cuantifica de imágenes grabadas como el tiempo en que el ratón permanece

inmóvil, a excepción del movimiento producido por la respiración. En el caso de realizar repeticiones del test en la misma población de ratones en tiempos distintos, el contexto y el estímulo sonoro se modificó en cada repetición. En el caso del estímulo sonoro, se empleó 80 dB a 3000 Hz en un caso y 65 dB a 2000 Hz en otro. El choque eléctrico siempre se mantuvo a 0.2 mA.



**Figura 23. Evitación activa.** Esquema del protocolo usado en nuestras poblaciones de animales.



**Figura 24. Test de condicionamiento al miedo.** Esquema del protocolo que se siguió para nuestras poblaciones de animales.

## 8. Anticuerpos utilizados

Durante esta Tesis Doctoral se han utilizado los siguientes anticuerpos:

Anticuerpo primario	Casa comercial	Dilución de uso	Especie de origen
anti-A $\beta$ (82E1)	Invitrogen	1:1000	Ratón
anti-CaMKII	Cayman Chemical	1:1000	Ratón
anti-CASK	BD	1:1000	Ratón
anti-Cyto-Nrx (Nrx1,2,3)	Synaptic Systems	1:500	Conejo
anti-HA	Roche	1:500	Rata
anti-NLGN1	NeuroMab	1:1000	Ratón
anti-NLGN1 (4C12)	Synaptic Systems	1:1000	Ratón
anti-NLGN2	Synaptic Systems	1:1000	Ratón

**Tabla 3-1. Lista de anticuerpos primarios utilizados.**

Anticuerpo primario	Casa comercial	Dilución de uso	Especie de origen
anti-NLGN3	Neuromab	1:1000	Ratón
anti-N-Cadherina	Biological Laboratories	1:1000	Ratón
anti-Nicastrina	Sigma Aldrich	1:1000	Conejo
anti-NR1	Synaptic Systems	1:1000	Ratón
anti-Pan-Nrx	Dean et al., 2003	1:1000	Pollo
anti-PS1-NTF	Calbiochem	1:1000	Conejo
anti-PSD95	Thermo Scientific	1:1000	Ratón
anti-SNAP25	Sigma Aldrich	1:3000	Ratón
anti-vGAT	Synaptic Systems	1:2000	Conejo
anti-vGLUT	Synaptic Systems	1:2000	Conejo
anti- $\alpha$ Tubulina	Synaptic Systems	1:2000	Ratón
anti- $\beta$ Actina	Sigma Aldrich	1:1000	Ratón

**Tabla 3-2. Lista de anticuerpos primarios utilizados.**

Anticuerpo secundario	Casa comercial	Dilución de uso	Especie de origen
anti-rata-HRP	Jackson ImmunoResearch	1:5000	Cabra
anti-ratón-HRP	Jackson ImmunoResearch	1:5000	Cabra
anti-ratón cadena ligera-HRP	Jackson ImmunoResearch	1:5000	Cabra
anti-conejo-HRP	Jackson ImmunoResearch	1:5000	Cabra
anti-pollo-HRP	Jackson ImmunoResearch	1:5000	Conejo
anti-rata-Cy3	Jackson ImmunoResearch	1:800	Asno
anti-rata-biotina	Jackson ImmunoResearch	1:800	Cabra

**Tabla 4. Listado de anticuerpos secundarios utilizados.**

## IV. RESULTADOS



## 1. Modelos transgénicos de sobreexpresión del fragmento C-terminal de Neurexinas

Las PS, componentes catalíticos del complejo  $\gamma$ -secretasa, están mutadas con frecuencia en FAD. Las mutaciones en PS asociadas a FAD causan una pérdida parcial de actividad del complejo  $\gamma$ -secretasa, dando lugar al acúmulo de sus sustratos. En nuestro grupo se demostró que Nrxs es sustrato de PS y que su procesamiento tiene lugar en la sinapsis *in vivo*. Como consecuencia, el sustrato NrxCtf se acumula en terminales presinápticos de ratones PS cDKO que carecen de los genes PS1 y PS2 (Saura et al., 2011).

Con el objetivo de evaluar selectivamente el impacto del acúmulo del NrxCtf *in vivo* sin afectar la función de PS hacia el resto de sustratos, diseñamos aproximaciones experimentales para la generación de modelos de ratón transgénicos de sobreexpresión de NrxCtf.

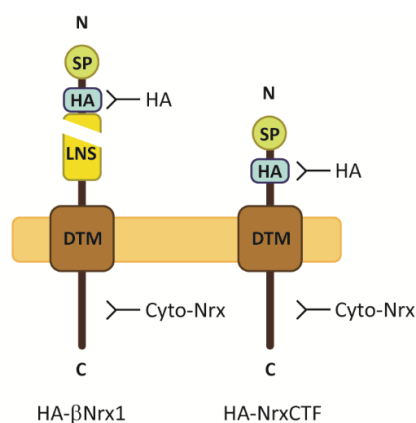
La escisión del gen de PS1 en los ratones PS cDKO ocurre por una actividad Cre dependiente del promotor CaMKII. Por tanto, para dirigir la expresión exógena de NrxCtf a las mismas sinapsis de las mismas regiones cerebrales donde ocurre el acúmulo endógeno de NrxCtf en los ratones PS cDKO, nuestros diseños de transgénesis se basaron en expresión regulada por el promotor CaMKII.

### 1.1. Caracterización *in vitro* de vectores de expresión de HA-NrxCtf

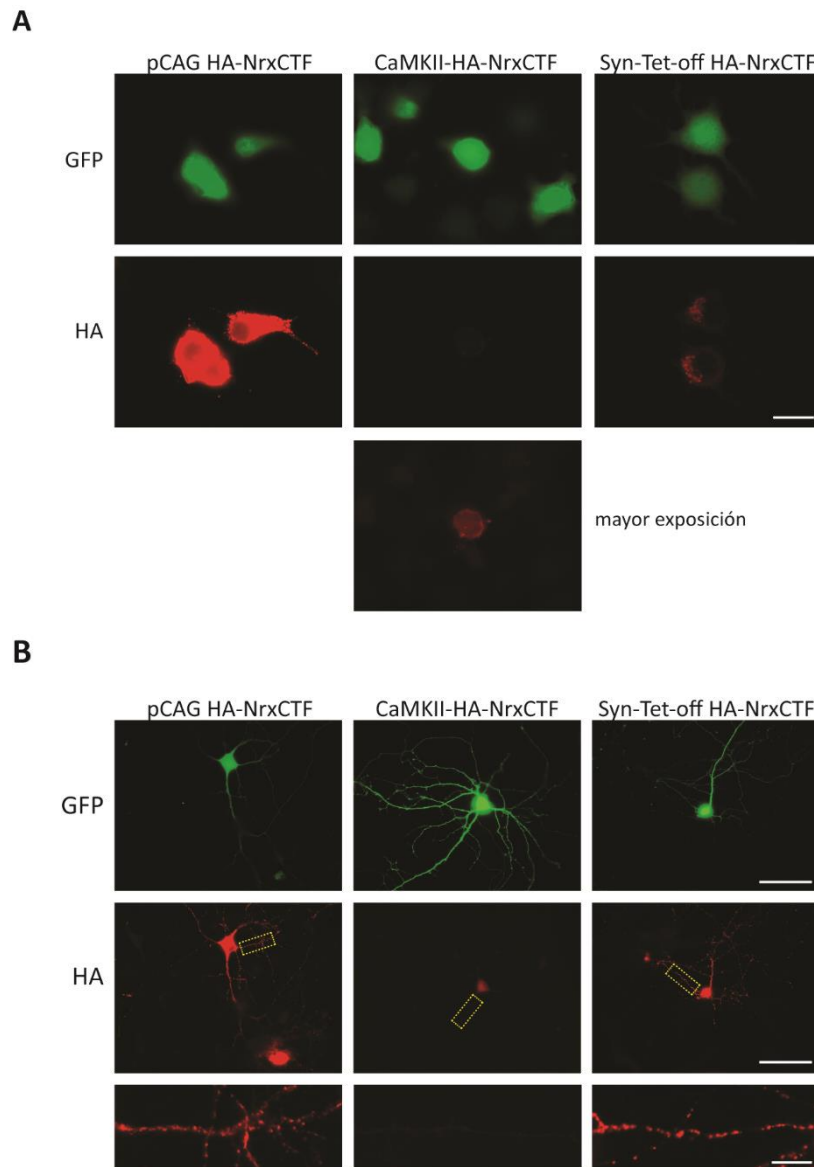
Previamente en el laboratorio se había generado un cDNA codificante para HA-NrxCtf que contiene un péptido señal en el extremo N-terminal, seguido de un epítipo HA y de la secuencia del C-terminal de Nr1 humana desde el residuo 386 (Figura 25). Esta construcción simula el sustrato NrxCtf procesado por PS y recapitula los déficits en liberación presináptica producidos por la pérdida de actividad de PS en cultivos de neuronas (Servián-Morilla et al., 2018).

El cDNA de HA-NrxCtf se clonó bajo el control del promotor CaMKII del vector

pMM403 (construcción CaMKII-HA-NrxCTF). El éxito de nuestra estrategia de transgénesis se basa en alcanzar niveles de expresión de HA-NrxCTF que sobrepasen la capacidad proteolítica de PS hacia este sustrato, resultando en su acúmulo. Debido a la actividad relativamente baja de los promotores específicos de tejido, como CaMKII, se podía prever desde un inicio unos niveles bajos de expresión por la construcción CaMKII-HA-NrxCTF. Por ese motivo, quisimos evaluar en paralelo los niveles de acúmulo de un sistema que, manteniendo la expresión neuronal, amplificase los niveles de expresión. Por ello, la secuencia HA-NrxCTF se clonó bajo el control del promotor inducible TRE del vector dual Syn-Tet-off (Gascón et al., 2008). El promotor TRE es inactivo en células eucariotas y necesita de la co-expresión del factor de transcripción tTA, que en el caso del vector dual Syn-Tet-off está regulada por el promotor neuronal de Sinapsina (Gascón et al., 2008). La expresión de HA-NrxCTF por los vectores CaMKII-HA-NrxCTF y Syn-Tet-off HA-NrxCTF se analizó en cultivos de células N2a y de neuronas hipocámpales de rata (Figura 26). Como control positivo, los cultivos se transfectaron con el vector pCAG HA-NrxCTF que contiene el potente promotor de  $\beta$ -actina. En todos los casos, los cultivos se co-transfectaron con GFP. En experimentos de inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-HA observamos mayores niveles de expresión de HA-NrxCTF con la construcción Syn-Tet-off HA-NrxCTF que con el vector CaMKII-HA-NrxCTF (Figura 26). Los niveles de HA-NrxCTF alcanzados por el vector Syn-Tet-off HA-NrxCTF fueron similares a los alcanzados por el vector pCAG HA-NrxCTF en las neuronas transfectadas. Por el contrario, los niveles de HA-NrxCTF con el vector CaMKII-HA-NrxCTF fueron muy bajos o prácticamente indetectables en estos experimentos (Figura 26).



**Figura 25. Esquema de la detección de la proteína HA- $\beta$ Nrx1 y HA-NrxCTF con los anticuerpos anti-HA y anti-Cyto-Nrx.** SP: péptido señal, LNS: dominio homólogo a laminina/neurexina/globina de unión a hormonas sexuales, DTM: dominio transmembrana, HA: etiqueta HA con la que están marcadas las construcciones.

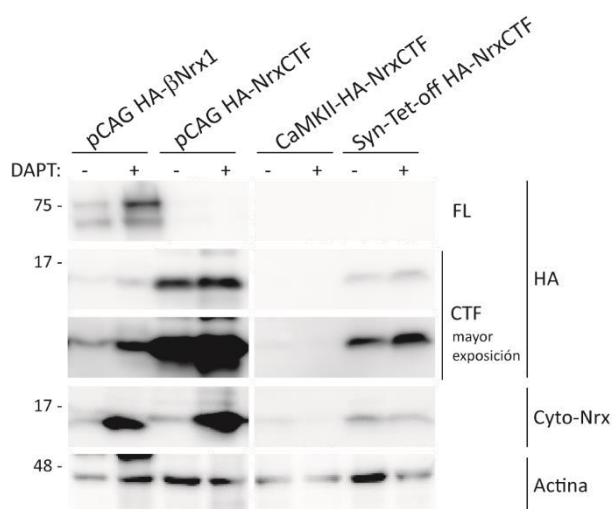


**Figura 26. Detección de la proteína HA-NrxCTF en células transfectadas mediante inmunofluorescencia.**

**A,** Células N2a cotransfectadas con GFP y pCAG HA-NrxCTF como control, con CaMKII-HA-NrxCTF y con Syn-Tet-off HA-NrxCTF. Inmunofluorescencia con anticuerpo anti-HA. Escala de tamaño: 50  $\mu$ m. **B,** Células de cultivo de neuronas hipocámpales de rata cotransfectadas con GFP y pCAG HA-NrxCTF como control, y vectores CaMKII-HA-NrxCTF y Syn-Tet-off HA-NrxCTF. Inmunofluorescencia con anticuerpo anti-HA. Escala de tamaño: 200  $\mu$ m, imagen magnificada: 25  $\mu$ m.

Resultados similares se obtuvieron en experimentos de *Western blot* de lisados de células N2a transfectadas con pCAG HA- $\beta$ Nrx1, pCAG HA-NrxCTF, CaMKII-HA-NrxCTF y Syn-Tet-off HA-NrxCTF. El vector Syn-Tet-off HA-NrxCTF produjo unos niveles de expresión de HA-NrxCTF de mayor magnitud que los niveles producidos por CaMKII-HA-NrxCTF, siendo éstos prácticamente indetectables con los dos anticuerpos ensayados

(anti HA y anti-Cyto-Nrx) (Figura 27).

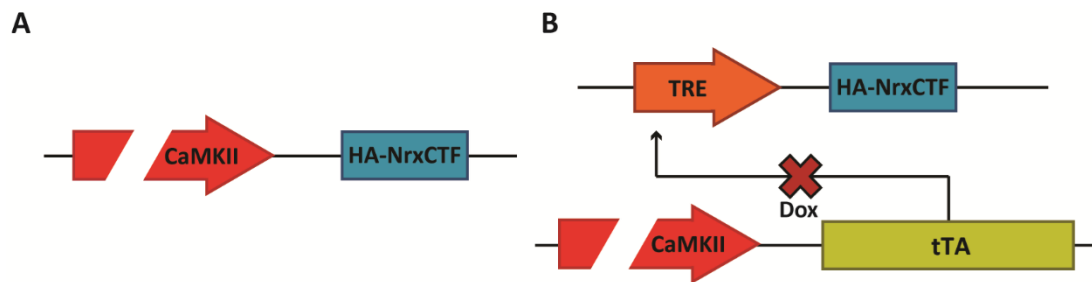


**Figura 27. Expresión de la sobreexpresión de la proteína HA-NrxCTF en células N2a mediante *Western blot*.** *Western blot* de células N2a transfectadas con pCAG HA-βNrx1, pCAG HA-NrxCTF, CaMKII-HA-NrxCTF y Syn-Tet-off HA-NrxCTF, tratadas o no con el inhibidor de la actividad γ-secretasa DAPT (5 μM). Los lisados se analizaron con los anticuerpos anti-HA y anti Cyto-Nrx.

## 1.2. Generación de ratones transgénicos de sobreexpresión constitutiva o inducible de la proteína HA-NrxCTF

Los resultados obtenidos en cultivos celulares indicaron mayores niveles de expresión de HA-NrxCTF mediante el empleo de sistemas de amplificación. Por tanto, decidimos emplear una estrategia doble de transgénesis para asegurar el éxito de la sobreexpresión de NrxCTF *in vivo* (Figura 28). Un primer modelo de transgénesis simple basado en la construcción CaMKII-HA-NrxCTF. Un segundo modelo basado en la construcción TRE-HA-NrxCTF, que requiere generar ratones dobles transgénicos que co-expresen el factor de transcripción tTA. En este último caso, se decidió usar ratones transgénicos CaMKII-tTA desarrollados previamente por otros autores y usados en otros proyectos en nuestro grupo (Mayford et al., 1996). Una ventaja adicional de la expresión regulada por tTA es que permite controlar la expresión temporal del transgén con antibióticos del grupo de las tetraciclinas, como la Dox. Por tanto, la especificidad de tejido está determinada en ambos modelos por el promotor CaMKII, si bien el sistema de expresión inducible ofrece la posibilidad teórica de controlar el momento temporal

de inicio de la expresión y de revertir la expresión del transgén en la vida adulta.



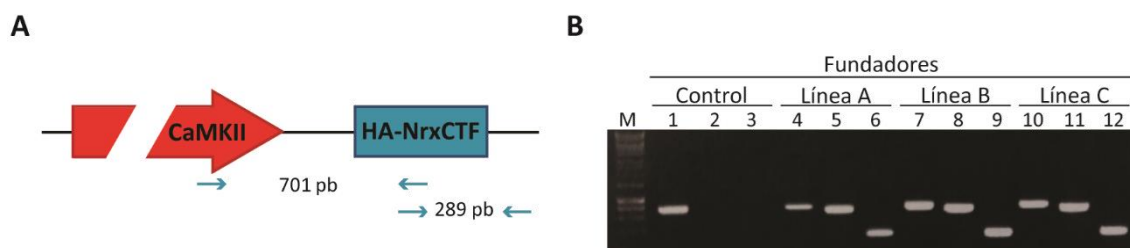
**Figura 28. Esquema de la estrategia doble de transgénesis para la sobreexpresión de NrxCtf. A,** Expresión constitutiva mediante la construcción CaMKII-HA-NrxCtf. **B,** Expresión inducible de HA-NrxCtf mediante el sistema Tet-off dirigido por el promotor CaMKII. Tras la generación de un primer ratón transgénico TRE-HA-NrxCtf se obtienen ratones dobles transgénicos mediante el cruce con ratones CaMKII-tTA. El factor de transcripción tTA se une al promotor TRE y activa la expresión de HA-NrxCtf. En cambio, en presencia de Dox esta unión se bloquea y la expresión de HA-NrxCtf se inhibe.

El diseño de las construcciones para la generación de los modelos constitutivo e inducible de HA-NrxCtf basados en el promotor CaMKII está detallado en el apartado 2 de Materiales y Métodos de esta Tesis Doctoral. Los ratones transgénicos se generaron mediante microinyección en cigotos de ratones FVB/N y fue llevado a cabo por el Servicio de Producción Animal del Centro de Producción y Experimentación Animal de la Universidad de Sevilla. En los apartados siguientes se describe la caracterización inicial de cada una de las líneas generadas en esta Tesis Doctoral.

### 1.3. Caracterización de la expresión de HA-NrxCtf *in vivo* en el modelo constitutivo CaMKII-HA-NrxCtf

La presencia del transgén CaMKII-HA-NrxCtf en las líneas fundadoras se estudió mediante genotipación por PCR con dos parejas de cebadores que amplifican secuencias específicas dentro del transgén (Figura 29). Las parejas de cebadores utilizadas están contenidas en la tabla T1 del apartado 3.4. de Materiales y Métodos.

Del total de los ratones obtenidos tras la microinyección, 4 fueron positivos para



**Figura 29. Modelo constitutivo de expresión de HA-NrxCTF.** A, Esquema gráfico del transgén CaMKII-HA-NrxCTF. Se representan entre flechas los tamaños de los productos de PCR de las parejas de oligonucleótidos usados para la genotipación del modelo. B, Genotipado en un gel de agarosa 1% de los fundadores que se obtuvieron para este modelo y de un control negativo del mismo. Carriles 1, 4, 7, 10: control positivo; 2, 5, 8, 11: fragmento CaMKII-HA-NrxCTF 1 (701 pb); 3, 6, 9, 12: fragmento CaMKII-HA-NrxCTF 2 (289 pb).

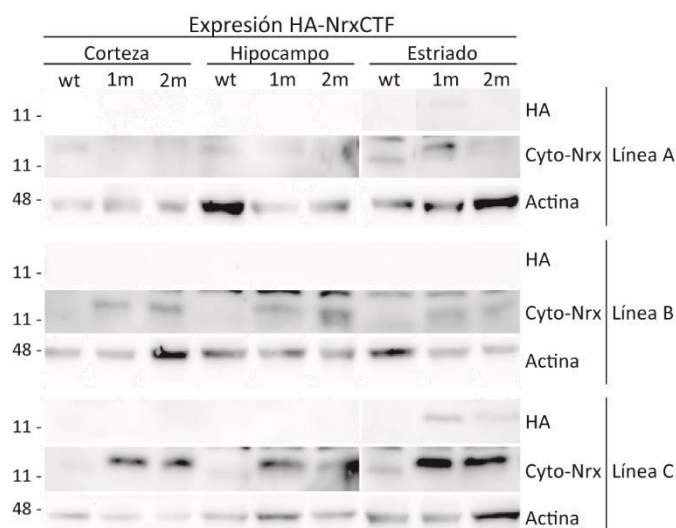
el transgén CaMKII-HA-NrxCTF (19%). A continuación, estos animales se cruzaron con ratones FVB obteniéndose descendencia en 3 de los 4 fundadores (líneas A, B, C) (Tabla 5). En la Tabla A1 se muestran las frecuencias de los genotipos obtenidos para cada línea. Sólo en la línea C parece cumplirse la frecuencia esperada del 50%, aunque es muy posible que el bajo número de ratones de la población ensayada fuera insuficiente para obtener unos datos de frecuencia robustos en las otras dos líneas (A y B).

Línea A	Machos	Hembras
<i>wild type</i>	1 (14.3%)	6 (42.9%)
CaMKII-HA-NrxCTF	6 (85.7%)	8 (57.1%)
Nº de ratones	7	14
Línea B	Machos	Hembras
<i>wild type</i>	7 (77.8%)	12 (70.6%)
CaMKII-HA-NrxCTF	2 (22.2%)	5 (29.4%)
Nº de ratones	9	17
Línea C	Machos	Hembras
<i>wild type</i>	48 (53.3%)	43 (46.7%)
CaMKII-HA-NrxCTF	42 (46.7%)	49 (53.3%)
Nº de ratones	90	92

**Tabla 5. Frecuencias genotípicas de las líneas A, B y C del modelo constitutivo CaMKII-HA-NrxCTF.** Se presenta el número y el porcentaje del total de ratones por genotipo y sexo para cada una de las líneas y el número de ratones genotipados en cada una de ellas.

Para analizar la expresión de la proteína HA-NrxCTF en las diferentes líneas se realizaron experimentos de *Western blot* de lisados de regiones cerebrales en las que es activo el promotor CaMKII (corteza, hipocampo y estriado). La expresión se analizó con

los anticuerpos anti-HA y anti-Cyto-Nrx a los 1 y 2 meses de edad. Los resultados obtenidos de estos experimentos mostraron un cierto acúmulo de la proteína HA-NrxCTF detectada con el anticuerpo anti-HA en lisados de estriado de ratones de la línea C (Figura 30). El anticuerpo anti-Cyto-Nrx reconoce el dominio citoplásmico de las Nrxs endógenas y de la construcción HA-NrxCTF (Figura 25), permitiendo comparar los niveles relativos de acúmulo de NrxCTF exógena respecto de los niveles endógenos. El anticuerpo anti-Cyto-Nrx detectó acúmulo de NrxCTF exógena en lisados de corteza, hipocampo y estriado de los ratones de las líneas B y C. El nivel relativo de acúmulo de HA-NrxCTF fue mayor en la línea C que en la B. La menor movilidad de la banda HA-NrxCTF reconocida con el anticuerpo anti-Cyto-Nrx respecto de la proteína endógena se debe probablemente a la presencia del epítipo HA. También se estudiaron los niveles de expresión mediante *Western blot* a edades más avanzadas en las distintas líneas, no mostrándose alteraciones con respecto a los resultados obtenidos a 1 y 2 meses (datos no mostrados). Se evaluó por inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-HA la localización de la proteína HA-NrxCTF en el cerebro de ratones de 6 meses de la línea de mayor expresión, la línea C. Sin embargo, no se obtuvieron resultados positivos, posiblemente debido a los bajos niveles de expresión (datos no mostrados).



**Figura 30. Expresión de la proteína HA-NrxCTF en las líneas A, B y C del modelo constitutivo CaMKII-HA-NrxCTF mediante *Western blot*.** Expresión de NrxCTF en corteza, hipocampo y estriado en las tres líneas de expresión (A, B, C) a 1 y 2 meses de edad analizados con el anticuerpo anti-HA y anti-Cyto-Nrx. Como control de carga se usó actina.

Esta caracterización superficial sugería una expresión muy baja de la proteína exógena HA-NrxCTF en las diferentes líneas transgénicas del modelo constitutivo CaMKII-HA-NrxCTF.

#### 1.4. Caracterización de la expresión de HA-NrxCTF *in vivo* en el modelo de ratón transgénico inducible NrxCTF

Como se ha mencionado, para dirigir la expresión inducible de HA-NrxCTF mediante el sistema Tet-off se requiere la generación inicial de ratones transgénicos TRE-HA-NrxCTF. La presencia del transgén TRE-HA-NrxCTF en las posibles líneas fundadoras se analizó por *PCR* con dos parejas de oligonucleótidos (Figura 31), incluidos en la Tabla 5 del apartado de 3.4. de Materiales y Métodos y se analizó por *PCR*. Del total de ratones que se obtuvieron tras la microinyección, tres fueron portadores del transgén (8%). En los tres fundadores se transfirió el transgén a su descendencia tras cruzarlos con FVB (líneas TRE-HA-NrxCTF A, B y C). Sin embargo, del fundador TRE-HA-NrxCTF A se obtuvo un número bajo de descendientes y éstos nunca tuvieron descendencia. Todas las líneas presentaron una frecuencia mendeliana cercana a la esperada (Tabla 6).

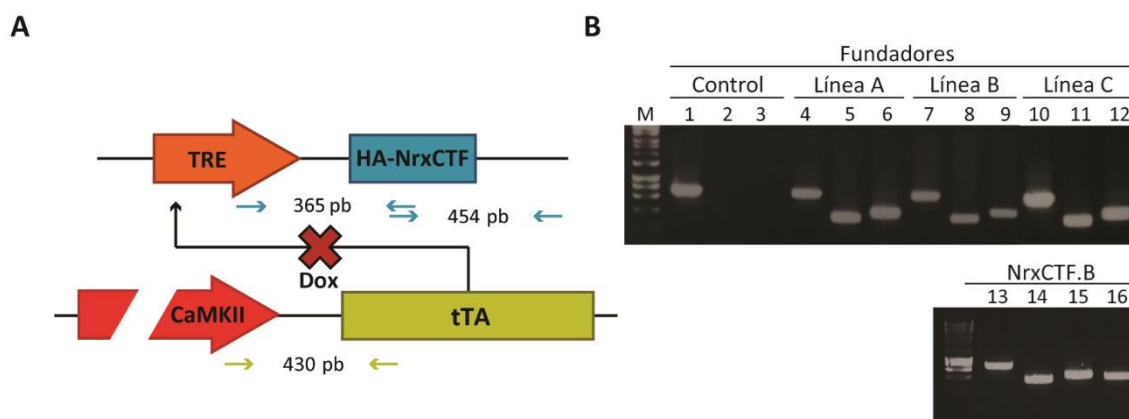
<b>Línea A</b>	<b>Machos</b>	<b>Hembras</b>
<i>wild type</i>	5 (55.6%)	3 (60.0%)
TRE-HA-NrxCTF	4 (44.4%)	2 (40.0%)
Nº de ratones	9	5
<b>Línea B</b>	<b>Machos</b>	<b>Hembras</b>
<i>wild type</i>	14 (58.3%)	13 (54.2%)
TRE-HA-NrxCTF	10 (41.7%)	11 (43.8%)
Nº de ratones	24	24
<b>Línea C</b>	<b>Machos</b>	<b>Hembras</b>
<i>wild type</i>	13 (56.5%)	16(61.5%)
TRE-HA-NrxCTF	10 (43.5%)	10(38.5%)
Nº de ratones	23	26

**Tabla 6. Descendencia de los fundadores de las líneas A, B y C de los simples transgénicos TRE-HA-NrxCTF.**

Una vez que se obtuvieron las dos líneas de ratones simples transgénicos TRE-HA-NrxCTF, éstas se cruzaron con la línea CaMKII-tTA (Mayford et al., 1996). La presencia de ratones dobles transgénicos TRE-HA-NrxCTF; CaMKII-tTA se analizó por *PCR* con sondas específicas en la descendencia (Figura 31). Para las dos líneas TRE-HA-NrxCTF se



obtuvieron sus correspondientes líneas de ratones dobles transgénicos (Figura 31), aunque como se discutirá más adelante la frecuencia de ratones dobles transgénicos fue menor a la esperada. Por simplicidad, en el resto de esta memoria los ratones dobles transgénicos obtenidos de cada línea se llamarán ratones NrxCtF.B y NrxCtF.C.

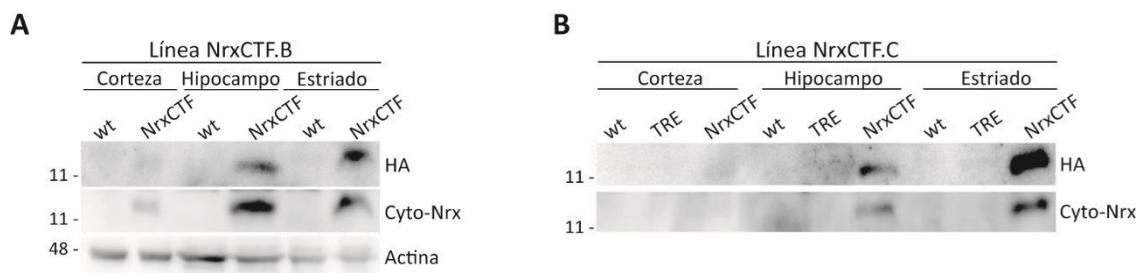


**Figura 31. Modelo inducible de sobreexpresión de NrxCtF.** **A**, Esquema del sistema Tet-off empleado para generar la línea de ratón inducible doble transgénico NrxCtF. Se representan entre flechas los tamaños de los productos de PCR de las parejas de oligonucleótidos usados para la genotipación del modelo. **B**, Genotipación con un gel de agarosa 1% de las tres líneas fundadoras TRE-HA-NrxCtF (A, B, C) que se obtuvieron, de un control negativo del mismo y de ratón doble transgénico NrxCtF.B. Carriles 1, 4, 7, 10, 13: control positivo; 2, 5, 8, 11, 14: fragmento TRE-HA-NrxCtF 1 (365 pb); 3, 6, 9, 12, 15: fragmento TRE-HA-NrxCtF 2 (454 pb); 16: fragmento CaMKII-tTA (430 pb).

#### 1.4.1. Expresión de la proteína HA-NrxCtF *in vivo* en las líneas NrxCtF.B y NrxCtF.C

Con el objetivo de analizar los niveles de expresión de la proteína HA-NrxCtF en regiones cerebrales de interés (corteza, hipocampo y estriado), obtuvimos lisados de estas regiones de las líneas dobles transgénicas NrxCtF.B y NrxCtF.C y se analizaron mediante *Western blot*. El anticuerpo anti-HA reconoció una banda de peso molecular de 13 kDa en los carriles correspondientes a corteza, hipocampo y estriado en el caso de los ratones dobles transgénicos de la línea NrxCtF.B y no en los controles, siendo más altos los niveles de expresión en hipocampo y estriado que en corteza (Figura 32A). En el caso de la línea NrxCtF.C, observamos una banda del mismo peso molecular en estriado e hipocampo, pero no en corteza. Los mismos lisados se testaron con el

anticuerpo anti-Cyto-Nrx, dando lugar a una banda de peso molecular equivalente al observado con el anticuerpo anti-HA y presentando resultados similares a los observados con ese anticuerpo (Figura 32B). Además, no se encontró escape de expresión en las líneas simples transgénicas TRE-HA-NrxCTF.C (Figura 32B) y TRE-HA-NrxCTF.B (datos no mostrados).



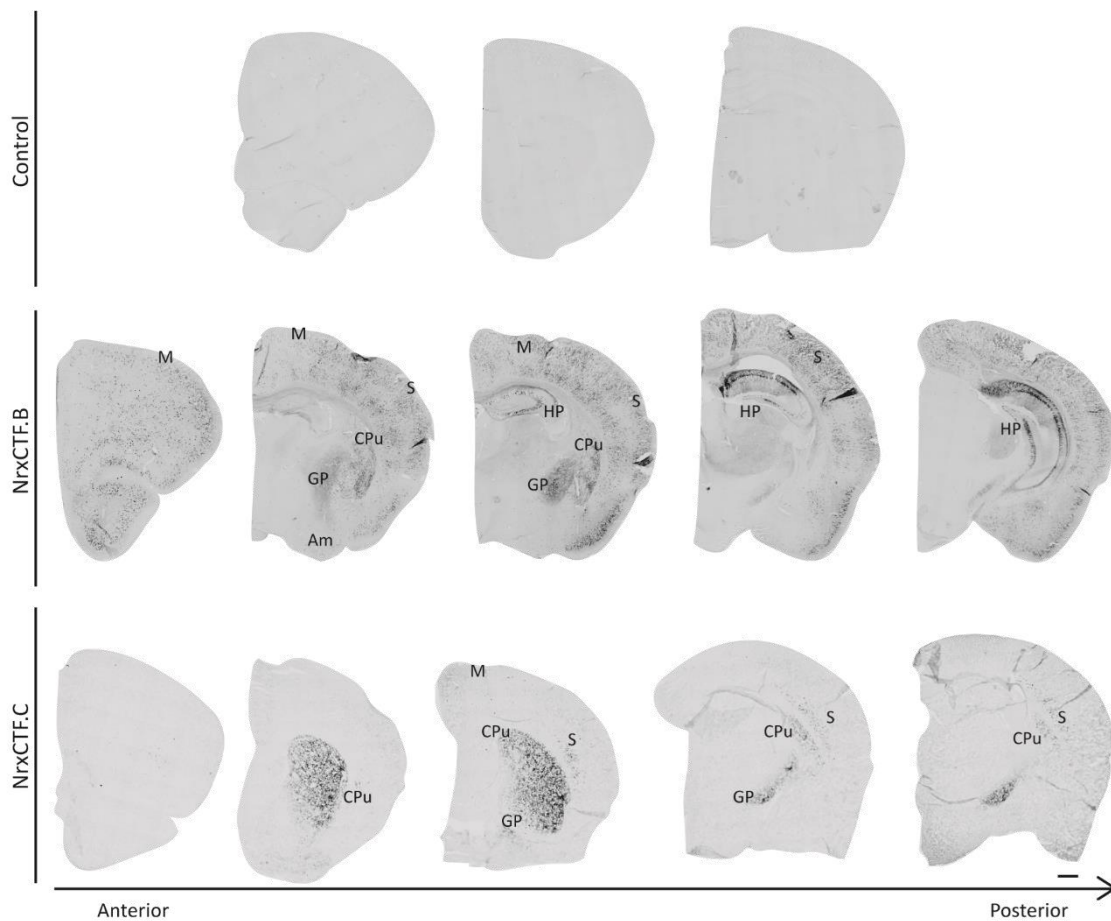
**Figura 32. Expresión de HA-NrxCTF en las líneas NrxCtf.B y NrxCtf.C en diferentes regiones cerebrales mediante *Western blot*.** **A**, Expresión de la línea NrxCtf.B en corteza, hipocampo y estriado a 1 mes de edad. **B**, Expresión de la línea NrxCtf.C en corteza, hipocampo y estriado a 1 mes de edad. A, B, Analizados con los anticuerpos anti-HA y anti-Cyto-Nrx. TRE: abreviatura para ratón simple transgénico TRE-HA-NrxCTF.

Con el fin de regionalizar la localización cerebral de la expresión de HA-NrxCTF en las líneas NrxCtf.B y NrxCtf.C, se realizaron experimentos de inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-HA (Figura 33). La tinción con anti-HA detectó somas positivas a lo largo del eje antero-posterior en diferentes zonas del cerebro. En el caso de la línea NrxCtf.B, se encontraron zonas positivas para HA-NrxCTF en corteza, hipocampo y estriado. Para la línea NrxCtf.C, se observaron zonas positivas en estriado y expresión muy localizada en corteza.

En la Tabla 7, se expone una descripción más precisa de todas las regiones positivas para la proteína HA-NrxCTF en ambas líneas (NrxCtf.B y NrxCtf.C).

Es posible que la detección de la expresión de la proteína HA-NrxCTF en la línea NrxCtf.C en corteza mediante inmunohistoquímica pero no por *Western blot* se deba a que el número de células positivas para el transgén es muy bajo para ser detectado mediante esta técnica. Por otra parte, la detección de HA-NrxCTF en el hipocampo mediante *Western blot* pero no mediante inmunohistoquímica, puede indicar que la expresión de HA-NrxCTF en el hipocampo en la línea NrxCtf.C provenga de axones que

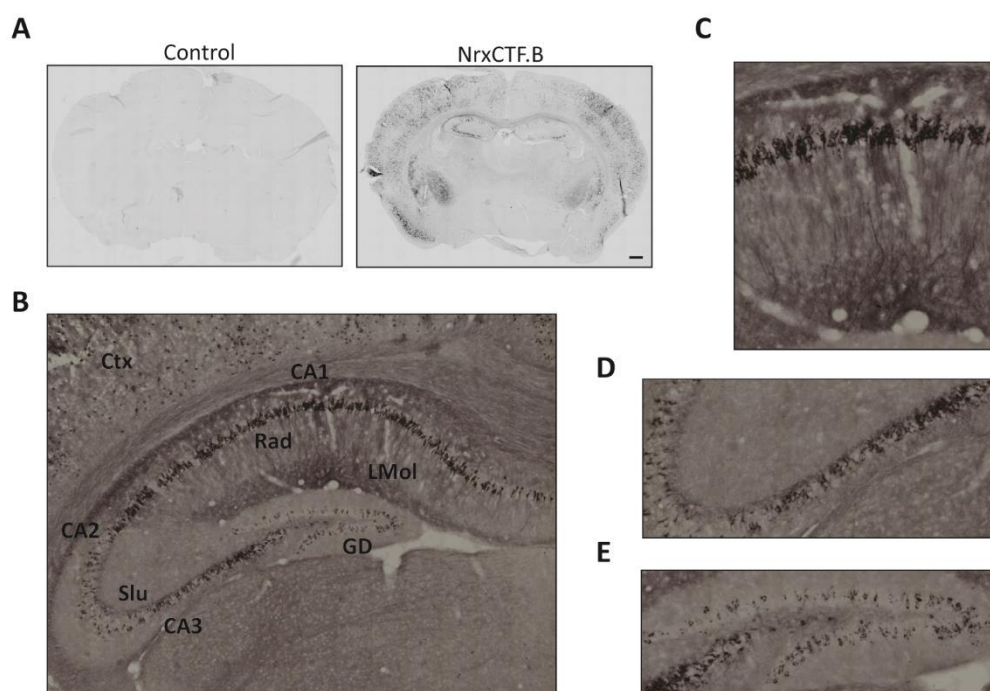
lo inervan, pero no de las células propias de éste. Los experimentos de inmunohistoquímica además nos permitieron estudiar el patrón subcelular de la proteína exógena HA-NrxCTF. En la línea NrxCTF.B, la más extensamente estudiada en esta Tesis Doctoral, se observó tinción positiva en zonas preferentemente presinápticas del hipocampo como son las proyecciones axonales hacia las neuronas piramidales de CA1 provenientes de neuronas piramidales de CA3 (vía colateral de Schaffer) y las terminaciones de las fibras musgosas en el *stratum lucidum* provenientes de las células granulares del giro dentado (GD) (Figura 34).



**Figura 33. Detección de la proteína exógena HA-NrxCTF en las líneas NrxCTF.B y NrxCTF.C a través del eje antero-posterior del cerebro mediante inmunohistoquímica. A,** Como control se muestra un animal *wild type*. **B,** Expresión de HA-NrxCTF en el ratón NrxCTF.B. **C,** Expresión de HA-NrxCTF en el ratón NrxCTF.C. M: Corteza motora, S: Corteza somatosensorial, CPu: Caudado putamen, GP: *Globus pallidus*, Am: Amígdala, HP: Hipocampo. Cortes coroneales de 20 µm de grosor. Anticuerpo utilizado: anti-HA. Las regiones mostradas a lo largo del eje antero-posterior son diferentes en cada línea y dependen del patrón de expresión concreto con el fin de mostrar más ampliamente las zonas positivas en cada una de ellas. Escala de tamaño: 500 µm.

	NrxCTF.B	NrxCTF.C
Corteza	Corteza motora, Somatosensorial, Piriforme, Frontal, Orbital, Ectorrinal, Visual, Auditiva, Perirrinal, Entorrinal, Asociativa, Prelímbica y Cingulada.	Corteza motora, Somatosensorial, Visual, Auditiva, Ectorrinal, Asociativa.
Hipocampo	Capas CA1, CA2, CA3 del hipocampo, Giro dentado, Capa Oriens, Capa Radiatum, Subículo, Stratum lucidum, Lacunosum moleculare, amígdala*.	
Estriado	Caudado putamen, Sustancia negra, Globo pálido.	Caudado putamen, Sustancia negra, Globo pálido, Cápsula interna.

**Tabla 7. Regiones positivas para la expresión de la proteína HA-NrxCTF en ratones de las líneas NrxCTF.B y NrxCTF.C.** \*La amígdala forma parte del sistema límbico, junto con el hipocampo.



**Figura 34. Detección de la proteína HA-NrxCTF en la línea NrxCTF.B mediante inmunohistoquímica.** **A,** Visión general de un corte de tejido de ratón control y un ratón NrxCTF.B. Escala: 500  $\mu$ m. **B,** Hipocampo de un ratón NrxCTF.B. **C,** Vista magnificada de CA1 de hipocampo. **D,** Vista magnificada de CA3 de hipocampo. **E,** Vista magnificada del giro dentado de hipocampo. CA1, CA2, CA3: capas del hipocampo, GD: giro dentado, LMol: *Stratum lacunosum moleculare*, Rad: *capa radiatum*, Ctx: corteza, Slu: *Stratum lucidum*.

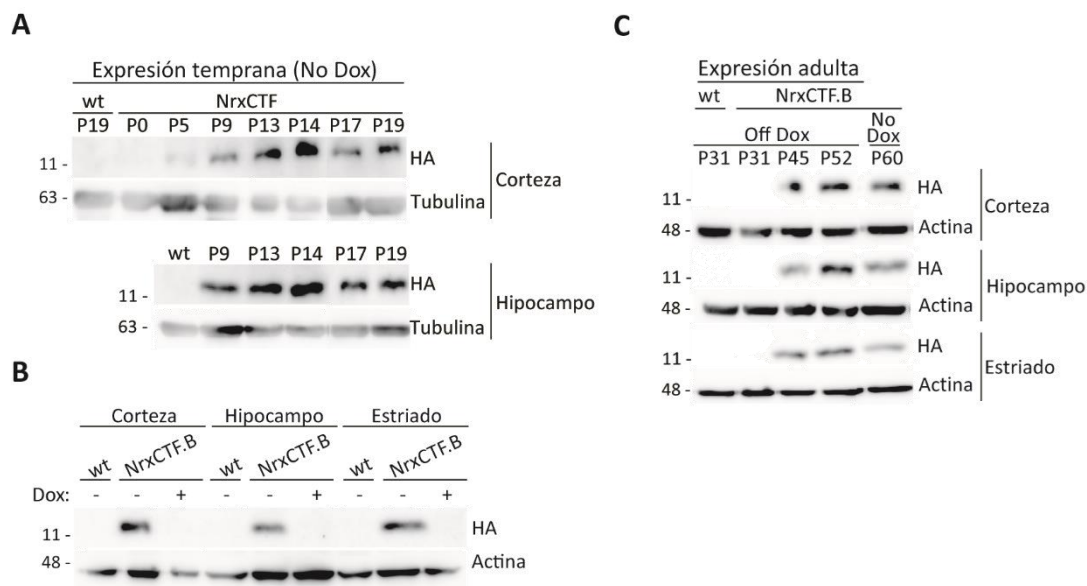
#### 1.4.2. Control temporal de la expresión de HA-NrxCTF con doxiciclina en el ratón NrxCTF.B

La expresión postnatal de HA-NrxCTF se analizó mediante experimentos de *Western blot* con el anticuerpo anti-HA. Observamos que el inicio de la expresión postnatal de HA-NrxCTF en lisados de corteza e hipocampo de la línea NrxCTF.B tiene lugar en la segunda semana tras el nacimiento y alcanza un nivel máximo de expresión en la tercera semana que se mantiene en la vida adulta (Figura 35A). Este patrón temporal de expresión postnatal es similar al observado para otra línea inducible generada en nuestro grupo (Rabaneda et al., 2014).

Una de las grandes ventajas de usar el sistema inducible Tet-off es que permite el control temporal de la expresión del transgén. En nuestro interés por testar la posibilidad de apagar la expresión de la proteína exógena HA-NrxCTF, alimentamos a ratones adultos NrxCTF.B con dieta con Dox durante 9 días y analizamos el apagado del transgén mediante *Western blot*. Este tratamiento resultó en el apagado de la expresión de HA-NrxCTF en las diferentes regiones analizadas (corteza, hipocampo y estriado) (Figura 35B). Además, observamos que ratones adultos alimentados con Dox durante 9 días re-expresaban HA-NrxCTF al retirar la dieta con Dox (datos no mostrados). Estos datos mostraron la posibilidad de apagar y volver a encender la expresión de HA-NrxCTF en el cerebro adulto.

Los experimentos anteriores mostraron el inicio de la expresión postnatal de HA-NrxCTF en los primeros días tras el nacimiento. Para analizar si podíamos retrasar el punto inicial de expresión de HA-NrxCTF en el cerebro adulto, se establecieron cruces entre ratones transgénicos simples alimentados con dieta con Dox. La dieta con Dox se mantuvo tras el parto en la madre lactante hasta el primer mes postnatal (P30). De este modo, la descendencia se mantuvo con dieta con Dox durante la vida embrionaria y postnatal temprana. En experimentos de *Western blot* de lisados obtenidos de estos ratones observamos que la expresión postnatal temprana del transgén se inhibe en las diferentes regiones de la línea NrxCTF.B. Sin embargo, la expresión de HA-NrxCTF se re-estableció 15 días (P45) después de retirar la dieta a niveles similares de los ratones adultos NrxCTF.B mantenidos en ausencia de Dox (Figura 35C). Esta estrategia de

expresión temprana (No Dox, expresión temprana de HA-NrxCTF) o de expresión adulta (On Dox P<30, Off Dox P>30, expresión adulta de HA-NrxCTF) se empleará a lo largo de esta Tesis Doctoral para controlar el inicio temporal de la expresión de HA-NrxCTF.

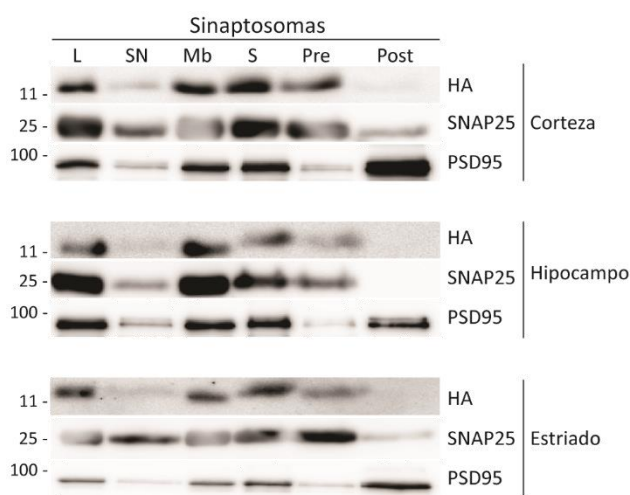


**Figura 35. Control temporal de la expresión de HA-NrxCTF con Dox en la línea NrxCTF.B.** **A**, Expresión postnatal en corteza e hipocampo analizados con el anticuerpo anti-HA mediante *Western blot*. **B**, Apagado de la expresión del transgén con Dox en corteza, hipocampo y estriado. **C**, Inicio de la expresión de HA-NrxCTF en el cerebro adulto tras el tratamiento con Dox desde el estado embrionario (E0) hasta el inicio del segundo mes de vida (P30) analizado con el anticuerpo anti-HA mediante *Western blot*.

### 1.4.3. Expresión sináptica de la proteína HA-NrxCTF en la línea NrxCTF.B

Las Nrxs participan en la formación y función sinápticas a través de un mecanismo presináptico (Dean et al., 2003). Además, el acúmulo endógeno de NrxCTF ocurre en terminales presinápticos (Saura et al., 2011). Por ello, una vez que comprobamos la expresión de HA-NrxCTF en regiones cerebrales, quisimos analizar la localización subcelular de HA-NrxCTF in vivo. Para ello decidimos aplicar un protocolo de fraccionamiento subcelular. Este proceso consiste en la purificación de los terminales nerviosos (sinaptosomas) para posteriormente separar los componentes del terminal presináptico y postsináptico mediante técnicas bioquímicas. Analizamos por *Western blot* las diferentes fracciones obtenidas de ratones control y NrxCTF.B de muestras de corteza, hipocampo y estriado, normalizadas por igual cantidad de proteína. El

enriquecimiento de SNAP25 y de PSD95 en el terminal presináptico y postsináptico, respectivamente, confirmó la correcta separación de los dos terminales (Figura R36). Utilizando el anticuerpo anti-HA observamos un enriquecimiento selectivo de la proteína HA-NrxCTF en la fracción presináptica comparado con la postsináptica (Figura R36). Por tanto, la localización presináptica de HA-NrxCTF muestra la misma distribución que NrxCTF endógena (Saura et al., 2011). Además, estos resultados obtenidos mediante fraccionamiento de sinaptosomas van en la línea del patrón de expresión sináptica que observamos en experimentos previos por inmunohistoquímica (Figura 34).



**Figura 36. Localización presináptica de HA-NrxCTF en la línea NrxCTF.B.** Fraccionamiento subcelular de sinaptosomas y análisis de HA-NrxCTF.B por *Western blot* con el anticuerpo anti-HA. Se muestran SNAP25 y PSD95 como marcadores de la fracción presináptica y postsináptica, respectivamente. Las fracciones analizadas son: L: lisado total, SN: material descartado, Mb: fracción de membrana, S: fracción de sinaptosomas, Pre: enriquecimiento presináptico, Post: enriquecimiento postsináptico.

#### 1.4.4. Análisis de los niveles de expresión de proteínas relacionadas con PS en la línea NrxCTF.B

Uno de los objetivos principales de nuestros modelos transgénicos es reproducir el acúmulo de NrxCTF sin afectar PS ni ningún otro componente del complejo  $\gamma$ -secretasa. Del mismo modo, también se pretendía que el procesamiento de otros sustratos de PS no se viera afectado por el acúmulo selectivo de HA-NrxCTF. Para descartar un efecto del acúmulo de HA-NrxCTF en componentes del complejo  $\gamma$ -secretasa, se realizaron experimentos de *Western blot* en muestras de corteza de



animales control (N=4) y animales de la línea NrxCtf.B (N=4) de 3 meses de edad. La presencia de HA-NrxCtf en estos lisados se confirmó con los anticuerpos anti-HA y anti-Cyto-Nrx. (Figura 37A). Los resultados muestran la presencia de una doble banda de misma movilidad con estos dos anticuerpos, siendo mayoritaria la banda de mayor movilidad frente a la banda de menor movilidad. La detección de una doble banda con cada anticuerpo sugiere que la misma secuencia del transgén HA-NrxCtf da lugar a dos bandas por mecanismos postraduccionales (Figura 37A).

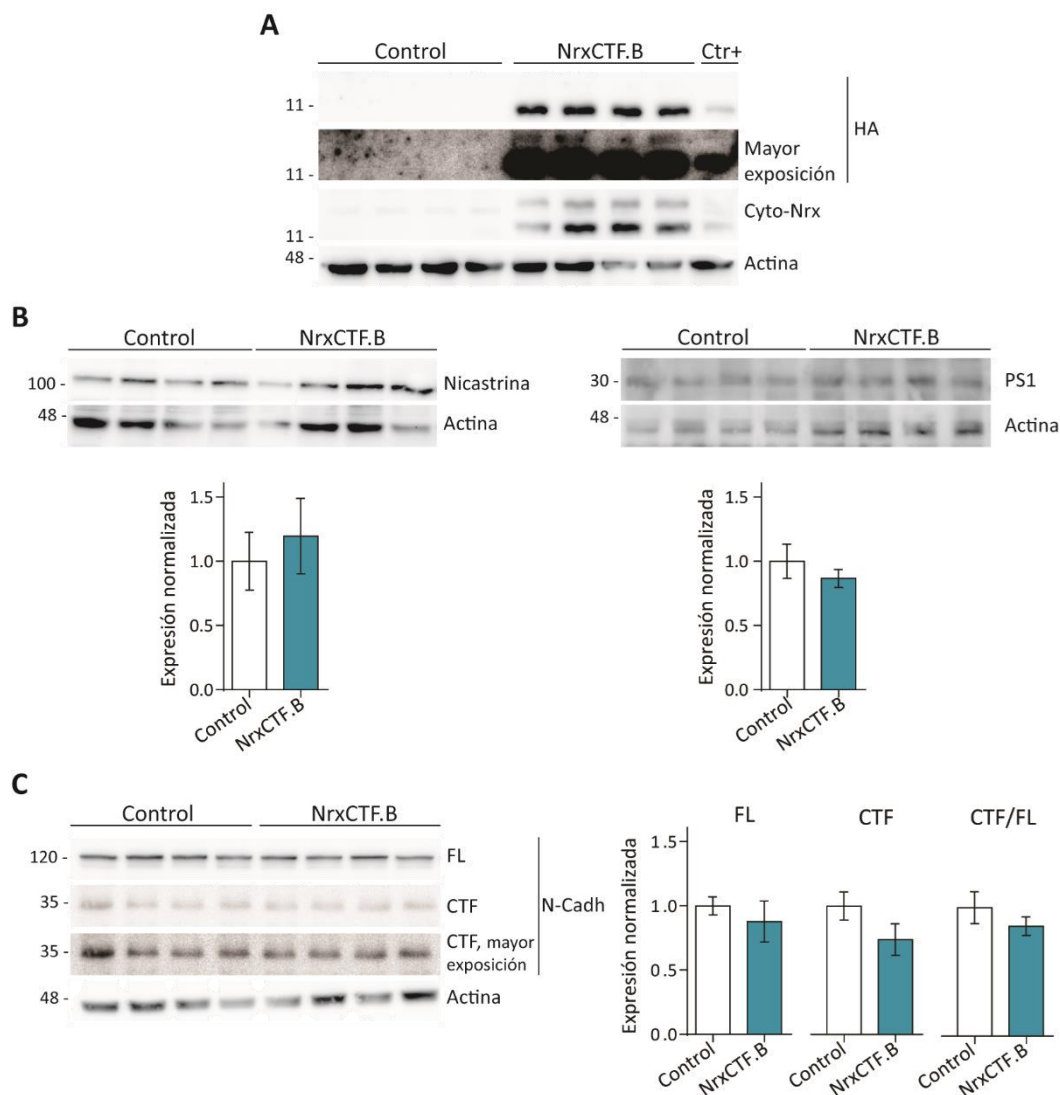
Con el fin de evaluar los niveles de expresión de proteínas asociadas al complejo  $\gamma$ -secretasa en estos ratones, decidimos analizar mediante *Western blot* los niveles de expresión de proteínas como Nicastrina y de las propias PS. Nicastrina es uno de los componentes del complejo  $\gamma$ -secretasa. Es una proteína transmembrana de tipo I que aparece para estabilizar a PS/ $\gamma$ -secretasa (Haapasalo y Kovacs, 2011). Los resultados obtenidos a partir de estos experimentos mostraron que no había diferencias significativas entre ratones control y ratones NrxCtf.B (Control:  $1 \pm 0.2249$ ; NrxCtf.B:  $1.196 \pm 0.2935$ ,  $p=0.6156$ ) (Figura 37B). Para detectar PS1 usamos un anticuerpo que reconoce el NTF de PS1, de unos 30 kDa. No se observaron cambios en los ratones NrxCtf.B con respecto a los controles (Control:  $1 \pm 0.12$ ; NrxCtf.B:  $0.87 \pm 0.07$ ,  $p=0.4087$ ) (Figura 37B). Esto indica que en nuestra línea inducible NrxCtf.B los componentes del complejo  $\gamma$ -secretasa como PS1 y Nicastrina no se ven afectados, cumpliendo así una de las premisas de nuestro modelo.

Para testar si otros sustratos de PS se pudieran ver afectados por la sobreexpresión de HA-NrxCtf, evaluamos la expresión de N-Cadherina. De entre los distintos sustratos de PS seleccionamos N-Cadherina ya que, de forma similar a Nrxs, es de una proteína de adhesión que participa en la formación y mantenimiento de la sinapsis. En experimentos de *Western blot* con un anticuerpo que reconoce el dominio citoplásmico de N-Cadherina se observaron dos bandas, una de aproximadamente unos 120kDa, que correspondía a la proteína completa, y otra de 35 kDa, correspondiente al CTF de N-Cadherina. Las cuantificaciones no mostraron diferencias significativas en los niveles normalizados de N-Cadherina-CTF entre los ratones NrxCtf.B y los ratones control de la línea (FL, Control:  $1.000 \pm 0.0711$ ; NrxCtf.B:  $0.8777 \pm 0.1602$ ,  $p=0.5117$ . N-Cadherina-CTF, Control:  $1.000 \pm 0.01097$ ; NrxCtf.B:  $0.7390 \pm 0.1228$ ,  $p=0.1640$ . N-Cadherina-



CTF/FL: Control:  $1.000 \pm 0.1239$ ; NrxCtf.B:  $0.8554 \pm 0.0718$ ,  $p=0.3516$ ) (Figura 37C).

En conjunto, estos resultados indicaron que los niveles y la actividad general del complejo  $\gamma$ -secretasa hacia sus sustratos no está afectada en los ratones NrxCtf.B.



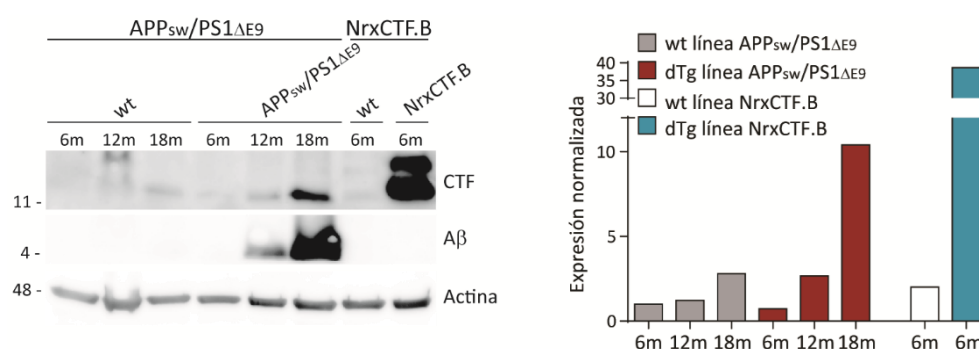
**Figura 37. Análisis de la expresión de proteínas relacionadas con PS en corteza de la línea NrxCtf.B de expresión temprana mediante Western blot.** **A**, Análisis de la expresión de HA-NrxCtf con los anticuerpos anti-HA y anti-Cyto-Nrx. **B**, Análisis de la expresión de los componentes del complejo de la  $\gamma$ -secretasa, Nicastrina y PS1, y su cuantificación. **C**, Análisis de la expresión de la proteína sustrato de PS, N-Cadherina (N-Cadh), y su cuantificación. FL: proteína completa. CTF: fragmento C-terminal. Como control de carga se usó actina. N=4 controles, N=4 NrxCtf.B. Edad de los ratones: 3 meses. Análisis estadístico: *t-test*. Todas las barras de error son SEM.

#### 1.4.5. Análisis de los niveles de acúmulo de HA-NrxCTF de la línea NrxCTF.B en comparación con el modelo APP<sub>sw</sub>/PS1<sub>ΔE9</sub>

A continuación nos interesó analizar si el nivel de acúmulo de HA-NrxCTF en nuestros modelos transgénicos se encuentra a niveles comparables del acúmulo endógeno de NrxCTF que ocurre en modelos de pérdida de función de PS. Aunque el acúmulo endógeno de NrxCTF lo habíamos analizado previamente en ratones PS cDKO (Saura et al., 2011), estos ratones no estaban a nuestra disposición en los momentos de realización de estos experimentos. Por ello, decidimos emplear ratones de la línea APP<sub>sw</sub>/PS1<sub>ΔE9</sub> que sobreexpresan un mutante de delección de PS1, además de la mutación sueca en APP asociada a AD (Jankowsky et al., 2004). Estos ratones se han empleado extensamente por la comunidad científica como modelo animal de AD. Para la realización de estos experimentos contamos con la colaboración del Dr. Javier Vitorica, catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Sevilla e investigador del IBiS, quien nos cedió las muestras de la línea APP<sub>sw</sub>/PS1<sub>ΔE9</sub>. Analizamos lisados de hipocampo de ratones APP<sub>sw</sub>/PS1<sub>ΔE9</sub> y sus propios controles de 6, 12 y 18 meses y los comparamos con una muestra representativa de hipocampo de ratones NrxCTF.B de 6 meses. Cada muestra de la línea APP<sub>sw</sub>/PS1<sub>ΔE9</sub> es un conjunto de 2-5 animales.

Para poder comparar los niveles de acúmulo entre NrxCTF endógeno y exógeno se empleó el anticuerpo anti-Pan-Nrx que reconoce el dominio citoplásmico de ambas proteínas. De forma notable, NrxCTF se detecta en el hipocampo de ratones control de 18 meses, pero no de 6 meses, indicando que NrxCTF se acumula durante el envejecimiento normal (Figura 38). Además, el acúmulo endógeno de NrxCTF se incrementa 2-3 veces en lisados de hipocampo de ratones APP<sub>sw</sub>/PS1<sub>ΔE9</sub> de 12 y 18 meses comparados con los controles de la misma edad (Control de la línea APP<sub>sw</sub>/PS1<sub>ΔE9</sub>: 6m: 1.000, 12m: 1.222, 18m: 2.791; APP<sub>sw</sub>/PS1<sub>ΔE9</sub>: 6m: 0.734, 12m: 2.663, 18m: 10.410; Control de la línea NrxCTF.B: 6m: 2.007; NrxCTF.B: 38.651) (Figura 38). El acúmulo de HA-NrxCTF en ratones adultos de la línea NrxCTF.B es 3.71 veces superior a los niveles de acúmulo presentados por ratones de 18 meses de la línea APP<sub>sw</sub>/PS1<sub>ΔE9</sub> (Figura 38). El péptido Aβ se acumula masivamente en los ratones APP<sub>sw</sub>/PS1<sub>ΔE9</sub> pero no en los

ratones NrxCtf.B, de acuerdo con que el procesamiento de PS hacia sus sustratos, APP en este caso, no se afecta en presencia de HA-NrxCTF (Figura 38). Por tanto, estos datos indican que nuestros abordajes resultan en un acúmulo moderado (3-4 veces) de HA-NrxCTF exógena comparado con el acúmulo endógeno producido por la pérdida de función de PS. Una comparación definitiva con los niveles y las regiones de acúmulo de NrxCtf requerirá el análisis de modelos de pérdida de función que no sobreexpresen alelos de PS1, como por ejemplo ratones PS cDKO (Saura et al., 2004, 2011).



**Figura 38. Comparación del acúmulo de HA-NrxCTF de la línea NrxCtf.B con el modelo transgénico APP<sub>sw</sub>/PS1<sup>ΔE9</sup> mediante Western blot en lisados de hipocampo.** Anticuerpos utilizados: anti-Pan-Nrx, anti-82E1 (reconoce el péptido Aβ). Como control de carga se usó actina.

Como conclusión general de estos abordajes podemos decir que hemos generado con éxito ratones transgénicos que acumulan selectivamente el sustrato de PS, NrxCtf, en el cerebro adulto sin actuar sobre la actividad general del complejo γ-secretasa. La localización subcelular en terminales presinápticos y los niveles de acúmulo de HA-NrxCTF se asemejan al acúmulo endógeno producido por la pérdida de función de PS/γ-secretasa *in vivo*. El acúmulo selectivo de HA-NrxCTF y su control temporal con Dox hizo de los ratones NrxCtf un modelo ideal para ensayar los efectos en comportamiento y en supervivencia neuronal asociados a AD, como se menciona en los apartados siguientes.

## 2. Caracterización general de las líneas NrxCtf.B y NrxCtf.C del modelo inducible de ratón transgénico

### 2.1. Frecuencia genotípica en las líneas NrxCtf.B y NrxCtf.C

Durante la caracterización de las líneas NrxCtf se observó una menor frecuencia de ratones dobles transgénicos, especialmente de la línea NrxCtf.C. Por ello, se decidió analizar en detalle la frecuencia genotípica de cada línea, NrxCtf.B y NrxCtf.C. De éstas se esperaban cuatro posibles genotipos con una frecuencia del 25%: *wild type*, simple transgénico TRE-HA-NrxCtf, simple transgénico CaMKII-tTA y doble transgénico NrxCtf (contiene ambos transgenes, TRE-HA-NrxCtf y CaMKII-tTA, dando lugar a la expresión de la proteína HA-NrxCtf).

Para la línea NrxCtf.B de expresión temprana (ratones mantenidos en ausencia de Dox) (Figura 35A), se observó que la frecuencia de los ratones dobles transgénicos NrxCtf.B era inferior a la esperada, obteniéndose un 16 % y 17 % de ratones dobles transgénicos, en machos y hembras, respectivamente (N total mayor a 500 animales) (Figura 39B). El resto de genotipos presentó una frecuencia ligeramente superior a la esperada (Figura 39B). Estos datos nos sugirieron un posible efecto prenatal debido a la expresión del transgén que impedía que todos los ratones NrxCtf.B llegaran a término, reduciendo así a la frecuencia de ratones NrxCtf.B nacidos.

Con el fin de analizar un posible impacto de la expresión prenatal del transgén, se establecieron cruces de ratones simples transgénicos (TRE-HA-NrxCtf; CaMKII-tTA) alimentados con Dox desde la gestación hasta el primer mes de vida del animal nacido (P30). En contraposición a los ratones de expresión temprana mantenidos en ausencia de Dox, el mantenimiento de la dieta con Dox durante la gestación y el desarrollo postnatal temprano induce el inicio de la expresión de HA-NrxCtf en el cerebro adulto (Figura 35C). Cuando estudiamos las frecuencias genotípicas en una población amplia de ratones (N total mayor a 190), observamos una recuperación de la frecuencia de los dobles transgénicos NrxCtf.B, incluso a valores ligeramente superiores a los esperados,

en detrimento de los ratones simples transgénicos (Figura 39B).

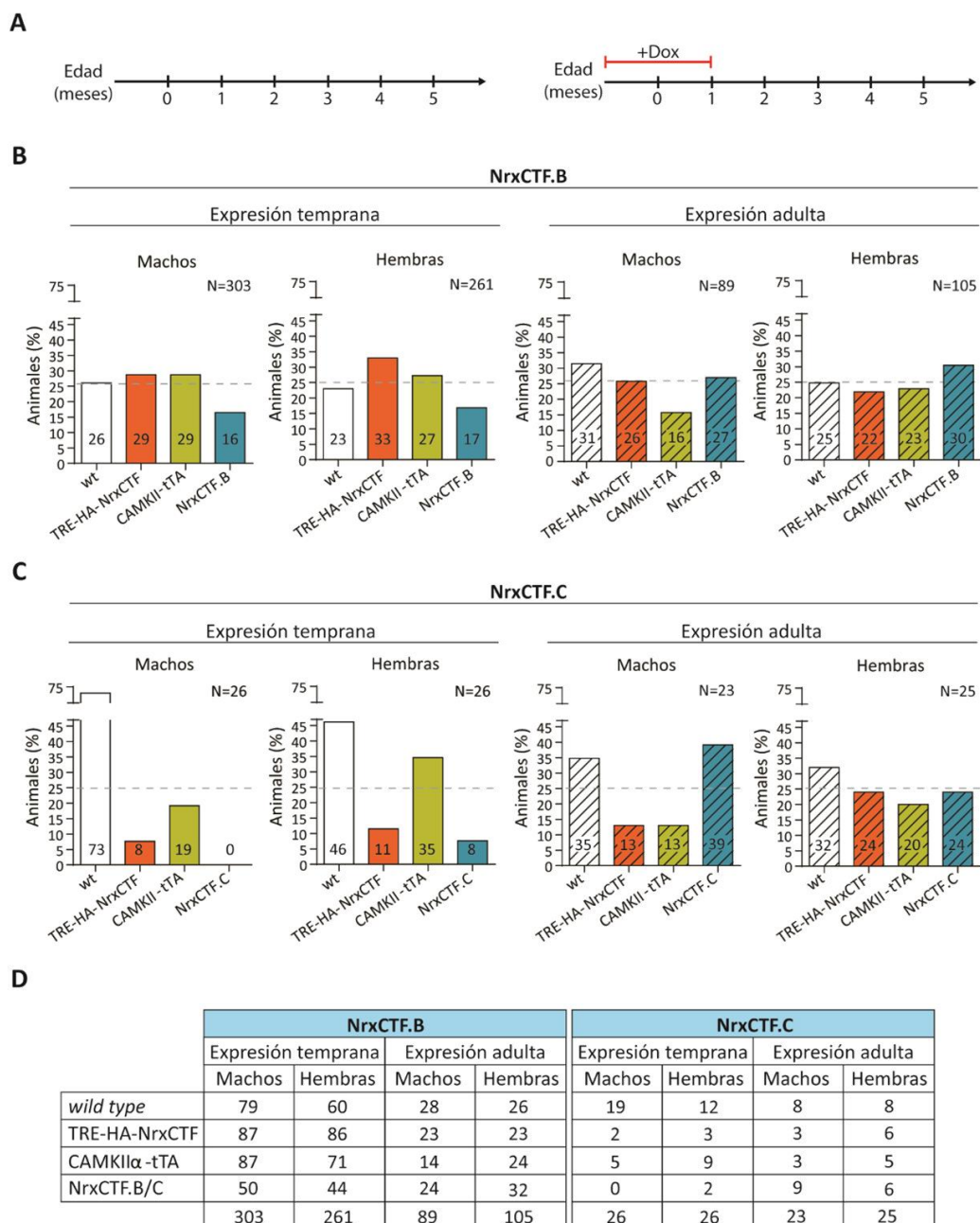
Cuando se testó la frecuencia genotípica en una población de 54 animales de la línea NrxCtf.C, se observó un número de ratones dobles transgénicos muy inferior a la frecuencia esperada, siendo 0 % en machos y 8 % en hembras, y con una frecuencia anormalmente alta de los ratones *wild type* para ambos sexos (Figura 39C). Por tanto, se decidió seguir el mismo protocolo que con la línea NrxCtf.B y generar ratones NrxCtf.C de expresión adulta tratando a la población en cruce con Dox desde la gestación hasta P30. Este abordaje resultó en la recuperación de las frecuencias esperadas, incluso con una presencia de ratones NrxCtf.C machos más alta de la esperada en detrimento de nuevo de los ratones simples transgénicos.

Debido a que la frecuencia de ratones NrxCtf.C con expresión temprana fue extremadamente baja, decidimos indagar la causa de la muerte prenatal. En una primera exploración para detectar el momento en el que tiene lugar la muerte en los ratones NrxCtf.C se genotiparon embriones a E16 (16 días de gestación). Se observó que de una camada de 8 embriones, 3 embriones fueron NrxCtf.C. Esta frecuencia es mucho más alta (37.5%) que la obtenida en animales nacidos con expresión temprana y presenta una frecuencia similar a la obtenida en la línea NrxCtf.C de expresión adulta (datos no mostrados). Por tanto, la muerte prenatal debe tener lugar entre E17 y P0.

A partir de estos resultados, podemos concluir que posiblemente debe haber un efecto deletéreo de la expresión de HA-NrxCtf en el estado prenatal que hace que no toda la población de embriones dobles transgénicos NrxCtf.B y NrxCtf.C llegue a nacer, siendo un efecto mucho más acusado en la línea NrxCtf.C. La inhibición, por tanto, de la expresión prenatal de HA-NrxCtf evita la muerte embrionaria de los ratones NrxCtf de las dos líneas.

## 2.2. Índice de mortalidad de la línea NrxCtf.B

Debido al descenso en la frecuencia de ratones NrxCtf al nacimiento, indicativo de una posible muerte embrionaria, decidimos estudiar la tasa de mortalidad tras el nacimiento.



**Figura 39. Frecuencia genotípica de ratones NrxCTF.B y NrxCTF.C en líneas de expresión temprana y adulta.** **A**, Esquema de tratamiento en la expresión temprana (no Dox) y adulta (tratamiento con Dox desde la gestación hasta P30). **B**, Frecuencia genotípica para la línea NrxCTF.B de expresión temprana y adulta. **C**, Frecuencia genotípica para la línea NrxCTF.C de expresión temprana y adulta. **D**, Tabla resumen del número de animales obtenidos para cada genotipo, sexo y línea de expresión en el ratón NrxCTF.B y NrxCTF.C. En B y C se representa la N total para cada una de las frecuencias obtenidas y en las barras de gráfico de cada genotipo se representa el porcentaje de ratones del total con ese genotipo.

En la línea de expresión temprana de NrxCTF.B, observamos que la tasa de mortalidad de ratones dobles transgénicos NrxCTF.B ascendió hasta el 34% en machos

y el 22% en hembras (Figura 40A), siendo la edad media de los ratones NrxCtf.B con muerte temprana de 37 días para machos y 27 días de vida para hembras. En esta población de estudio el destete se había establecido a P21 (21 días tras el nacimiento). Como gran parte de los ratones que morían lo hacían inmediatamente después del destete, se decidió alargar el momento del destete hasta P30 para ver si la muerte a edad temprana se encontraba afectada por la edad del destete (Figura 40A).

En nuevas poblaciones de animales destetados a p30 se detectó que seguía existiendo mortalidad temprana, 26% en machos y 20% en hembras, aunque ligeramente inferior a la observada con un destete a P21. La edad media de muerte de los ratones NrxCtf.B con muerte prematura ascendió a 64 días en machos y 34 en hembras. Sin embargo, se observó que un porcentaje significativo de la muerte ocurría incluso antes del destete (40% de animales tanto machos como hembras). Estos experimentos indicaron que aunque hay un efecto del momento del destete, la alta tasa de mortalidad de la línea NrxCtf.B no debía ser consecuencia únicamente del destete.

Para estudiar si la expresión de HA-NrxCtf era responsable de la muerte postnatal temprana, generamos poblaciones de ratones NrxCtf.B de expresión adulta mediante el establecimiento de cruces de líneas simples transgénicas en presencia de Dox hasta P30, edad a la que también se destetaron las camadas. De forma interesante, observamos que el tratamiento con Dox hacía desaparecer la muerte temprana de ratones NrxCtf.B tanto en machos como en hembras (Figura 40B). La expresión adulta de HA-NrxCtf tampoco resultó en muerte a las pocas semanas del inicio de la expresión, ya que los ratones NrxCtf.B presentaban una mortalidad similar a la del resto de genotipos durante el tiempo de seguimiento (4 meses). Posteriormente a este tiempo, la tasa de mortalidad tenía lugar en la misma proporción en los diferentes genotipos y en edades superiores a los 8 meses.

Estos datos sugieren que la expresión de HA-NrxCtf durante las primeras etapas del desarrollo aumenta la mortalidad temprana, un efecto que se puede evitar al retrasar la expresión de HA-NrxCtf al cerebro adulto. NrxCtf se acumula en embriones de ratones KO convencionales de PS1 (Saura et al., 2011), sugiriendo que la falta de procesamiento de Nrxs por PS podría afectar a la viabilidad neuronal del cerebro en desarrollo y

contribuir así a la mortalidad perinatal de los ratones KO de PS1 (Shen et al., 1997).

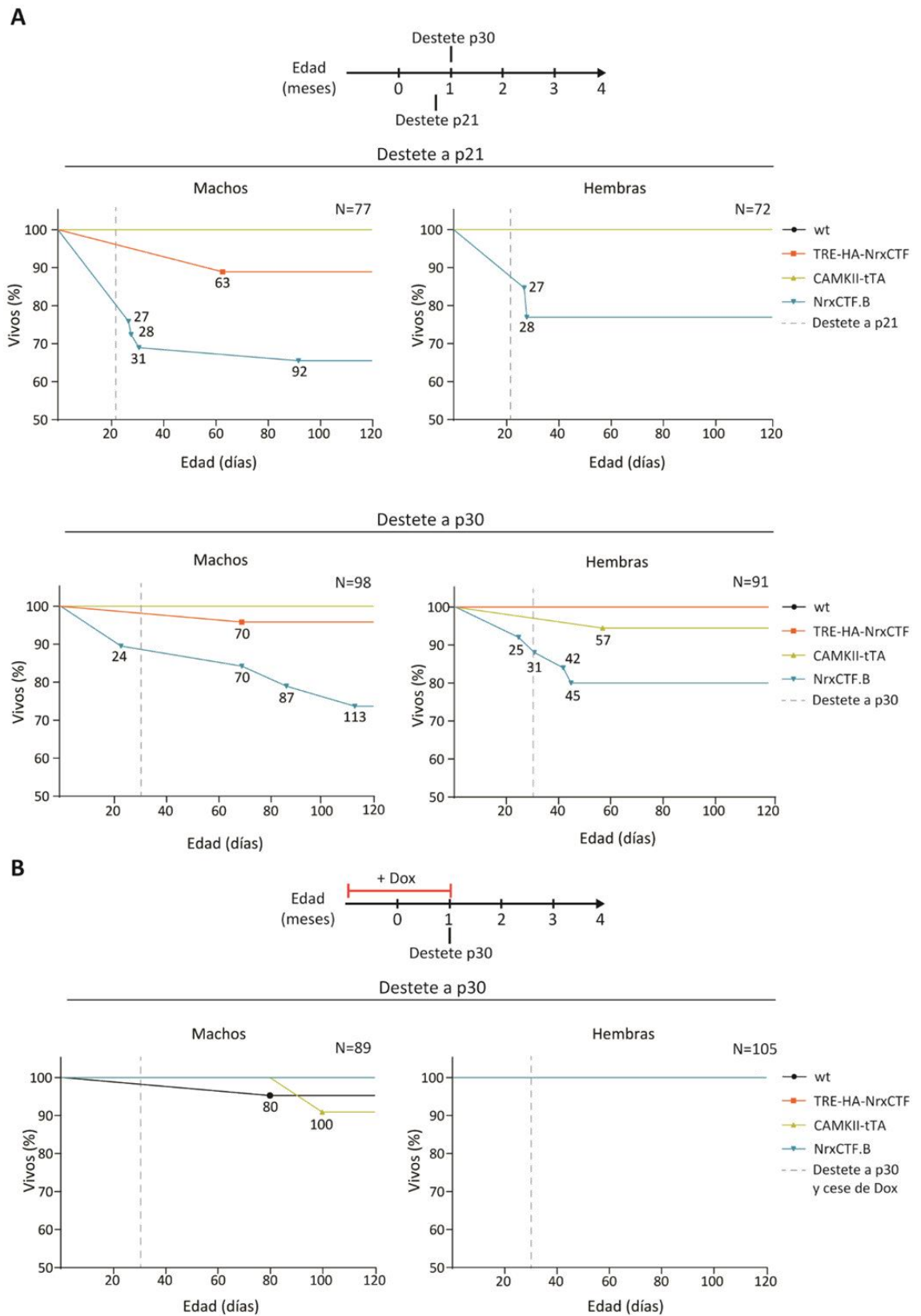


Figura 40. Tasa de supervivencia en el ratón NrxCTF.B en la línea temprana y (Continúa pie de figura→)

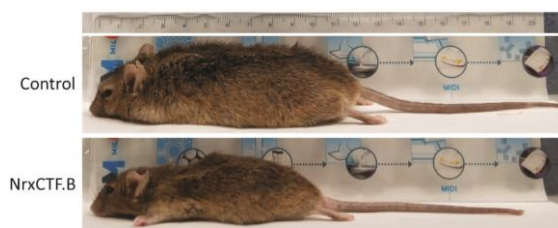


(←Continúa pie de figura) adulta de expresión. **A**, En la parte superior, esquema que indica el momento del destete la población. En la parte inferior, índice de supervivencia de ratones de la línea NrxCtf.B de expresión temprana con destete a P21 y P30. En éstos se indican los puntos exactos donde se ha producido la muerte de algún animal. **B**, En la parte superior, esquema que indica el momento del destete del animal y la duración del tratamiento con Dox. En la parte inferior, índice de supervivencia de ratones de la línea NrxCtf.B de expresión adulta y destetados a P30. Se indican los puntos de edad donde se ha producido la muerte de algún animal.

En la línea NrxCtf.C de expresión temprana no pudimos analizar la mortalidad debido al bajo número de animales dobles transgénicos nacidos. Por otra parte, no se observó mortalidad temprana tras el nacimiento en ratones NrxCtf.C de expresión adulta (datos no mostrados).

### 2.3. Curva de crecimiento de la línea NrxCtf.B

Debido a los efectos en la frecuencia genotípica y en la mortalidad temprana causados por la expresión de HA-NrxCtf decidimos emprender el estudio de otro parámetro morfológico, como es el peso corporal. Por ello, decidimos comparar el peso de los distintos genotipos de los ratones NrxCtf.B de forma periódica. Como resultado de estos experimentos obtuvimos que el peso de los ratones adultos NrxCtf.B es inferior a los que presentan sus hermanos de camada control (*wild type*, simple transgénico TRE-HA-NrxCtf y simple transgénico CaMKII-tTA) (Figura 41). Este efecto es más patente en machos (descenso del 26%) que en hembras (descenso del 10%), siendo también la N de estudio mayor en aquéllos. La diferencia en peso observada en hembras no alcanza significancia, pudiendo deberse al menor peso de las hembras adultas, suavizando las diferencias respecto a los machos (Figura 42).



**Figura 41. Fotografía de ratones macho control y NrxCtf.B de expresión temprana.** Edad: 18 meses. Tamaño del ratón hasta el inicio de la cola: Control: 12 cm, NrxCtf.B: 10 cm.

Para identificar el momento en que la diferencia de pesos se hace patente, se tomaron medidas de pesos desde los primeros días después del nacimiento. En machos NrxCtf.B se observaron diferencias significativas a P18 que se mantuvieron hasta la edad adulta, cuando el peso del animal deja de aumentar y se estabiliza. Esta diferencia inicial en peso a P18 ocurre a los pocos días de comenzar la expresión de HA-NrxCtf en los ratones NrxCtf-B de expresión temprana (Figura 42A).

Para analizar si los cambios en peso podrían ocurrir tras iniciar la expresión de HA-NrxCtf en el cerebro adulto, se tomaron medidas de peso en los ratones NrxCtf.B de expresión adulta (Dox hasta P30). Para ello, se siguieron los mismos criterios de toma de pesos que en la línea de expresión temprana, pero iniciándose la toma de pesos a P30, tras cesar la dieta con Dox. Aquí se observó que las diferencias de peso presentes en los ratones NrxCtf.B de expresión temprana desaparecían y todos los genotipos presentaban un peso similar entre ellos (Figura 42B).

Los ratones control presentan pesos similares en las poblaciones de expresión temprana y expresión adulta. Por tanto, el incremento de peso observado en ratones NrxCtf.B de expresión adulta con respecto a los ratones NrxCtf.B de expresión temprana, es debido al apagado de la expresión del transgén (desde E0 a P30) y no a un efecto de la dieta con Dox (Figura 42C<sub>2</sub>,C<sub>3</sub>).

Los resultados obtenidos a partir de esta recopilación de datos de frecuencia genotípica, mortalidad y crecimiento del animal en los que hemos observado una frecuencia genotípica más baja de la esperada en los ratones NrxCtf.B y NrxCtf.C, y una alta mortalidad temprana junto con un descenso en el peso corporal en los ratones NrxCtf.B, sugieren que el acúmulo de NrxCtf durante la vida embrionaria y postnatal temprana tiene un efecto deletéreo *in vivo*.

### 3. Caracterización conductual del ratón NrxCtf.B

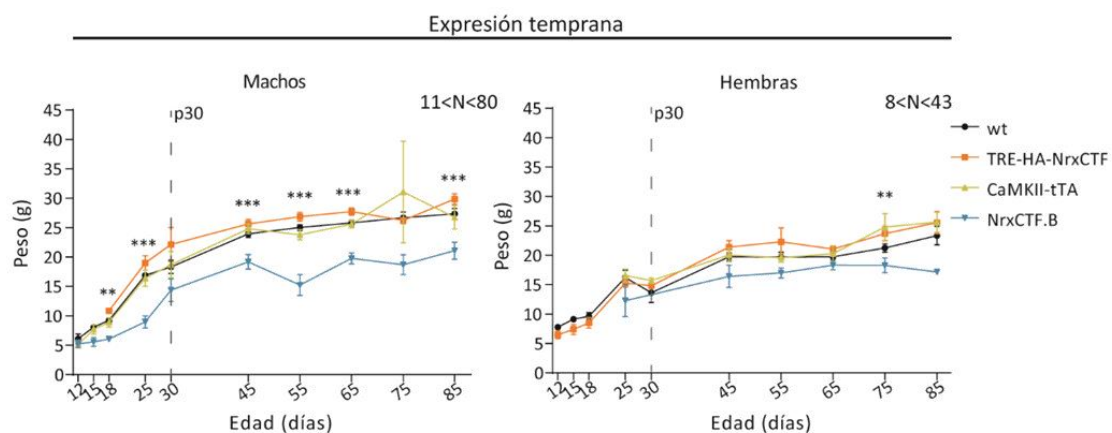
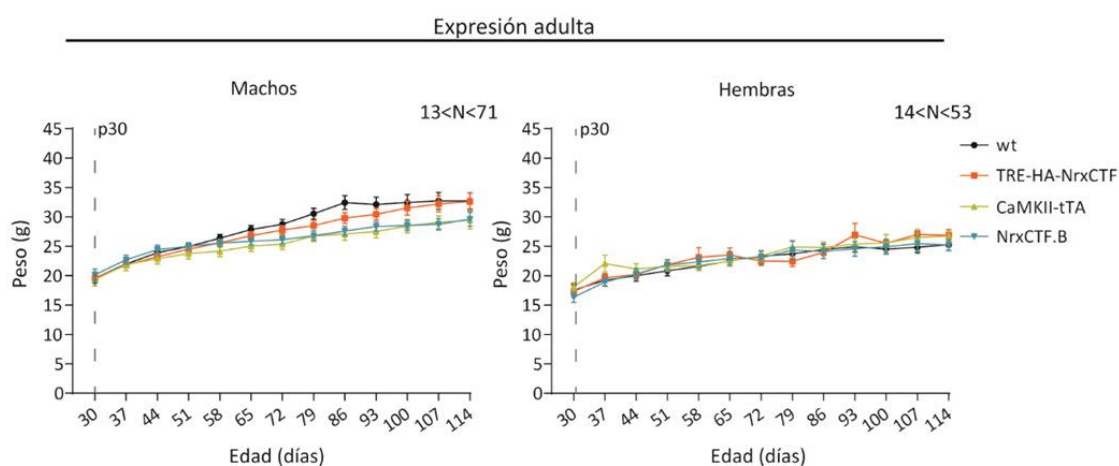
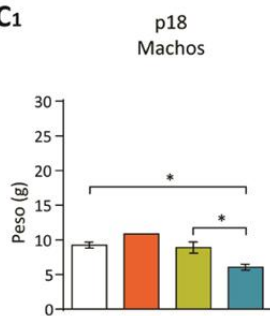
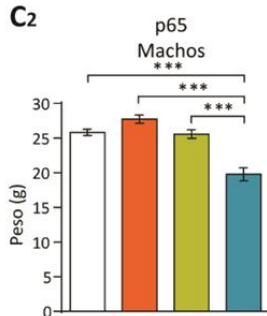
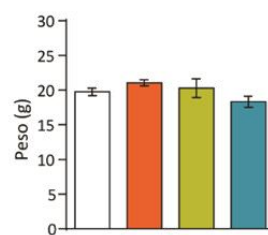
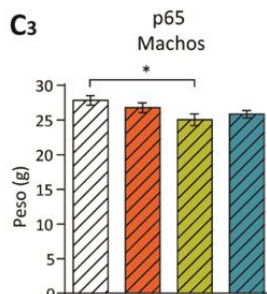
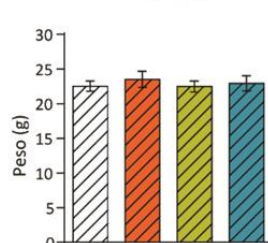
Una parte importante del diagnóstico de pacientes de AD depende de la evaluación de una serie de parámetros clínicos relacionados con un deterioro global y

progresivo de la memoria y el comportamiento. Para analizar si el acúmulo de NrxCtf conlleva defectos asociados a AD, decidimos caracterizar el comportamiento de los ratones NrxCtf mediante la realización de una serie de pruebas conductuales.

Los pacientes de AD presentan alteraciones en la locomoción como agitación psicomotriz, trastornos en el estado de ánimo como ansiedad, en algunas ocasiones aparecen estereotipias y se caracterizan por un deterioro progresivo de la memoria (American Psychiatric Association, 2013). Por ello se realizaron los tests de campo abierto y *Rotarod* (locomoción y aprendizaje motor), laberinto elevado en cruz (ansiedad), test de acicalamiento (estereotipias) y los tests de reconocimiento de nuevo objeto, evitación pasiva y activa y condicionamiento al miedo (memoria).

En experimentos anteriores encontramos un efecto diferencial de la expresión de la proteína HA-NrxCtf en el cerebro de ratones con inicio de expresión temprana y adulta. Debido a esto, se usaron dos aproximaciones de inicio de expresión del transgén HA-NrxCtf para el estudio del comportamiento del ratón adulto: i) expresión del transgén desde las etapas más iniciales del desarrollo (expresión temprana) y ii) expresión del transgén con inicio en la etapa adulta (expresión adulta). Esta segunda aproximación reproduce más fielmente la pérdida de procesamiento de NrxCtf selectivamente en la vida adulta. En ambos casos, decidimos estudiar el efecto en el comportamiento del animal a lo largo de su vida, al tratarse AD de una enfermedad asociada con el envejecimiento.

De las diferentes líneas transgénicas obtenidas seleccionamos los ratones NrxCtf.B. En todos los experimentos de comportamiento se utilizaron como control de los ratones NrxCtf.B sus hermanos de camada *wild type* o simples transgénicos (TRE-HA-NrxCtf y CaMKII-tTA). Las pruebas de comportamiento fueron realizadas por Francisco Martín (Técnico del Servicio de Fenotipaje del Centro de Producción y Experimentación Animal de la Universidad de Sevilla, FM, en el texto), por Celia Martín Cuevas (miembro de nuestro grupo, CMC, en el texto) y, la mayor parte, por la autora de esta Tesis, Ana Carmen Sánchez Hidalgo (ACSH, en el texto). En todos los casos, el investigador desconocía el genotipo de los ratones analizados hasta la obtención final de los resultados.

**A****B****C1****C2****p65 Hembras****C3****p65 Hembras**

**Figura 42. Curvas de crecimiento de las líneas de inicio de la expresión temprana y adulta del ratón NrxCtf.B.** **A**, Curva de crecimiento de ratones de la línea NrxCtf.B de expresión temprana. **B**, Curva de crecimiento de ratones de la línea NrxCtf.B de expresión adulta. (Continúa pie de figura →)

(←Continúa pie de figura) **C**, Representación de puntos de peso concreto. **C<sub>1</sub>**, Machos con 18 días de edad (P18) de expresión temprana donde ya se observan diferencias de peso del grupo NrxCtf.B con sus controles. **C<sub>2</sub>** y **C<sub>3</sub>**, Puntos concretos de peso, comunes entre la línea NrxCtf.B con expresión temprana (C<sub>2</sub>) y adulta (C<sub>3</sub>). Test estadístico: *One-way* ANOVA, *post-hoc* Bonferroni. *p* value: \**p*<0.05, \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001. Todas las barras de error son SEM.

### 3.1. Análisis fenotípico de una población de la línea NrxCtf.B con inicio de expresión temprana

#### 3.1.1. Cohorte de ratones para comportamiento

En todas las pruebas de comportamiento que se exponen a continuación, utilizamos una población común de entre 10-15 ratones control y 9-10 ratones dobles transgénicos NrxCtf.B de expresión temprana. A esta población de ratones se le evaluó fenotípicamente en varios puntos de su vida desde los 3 hasta los 20 meses de edad. La diferencia de edad existente en la población estaba comprendida en un rango de 1 mes y medio. Cada vez que se realizan pruebas conductuales en serie en un mismo momento de edad, éstas se ordenaron de menos a más agresivas.

#### 3.1.2. Evaluación general del estado del animal

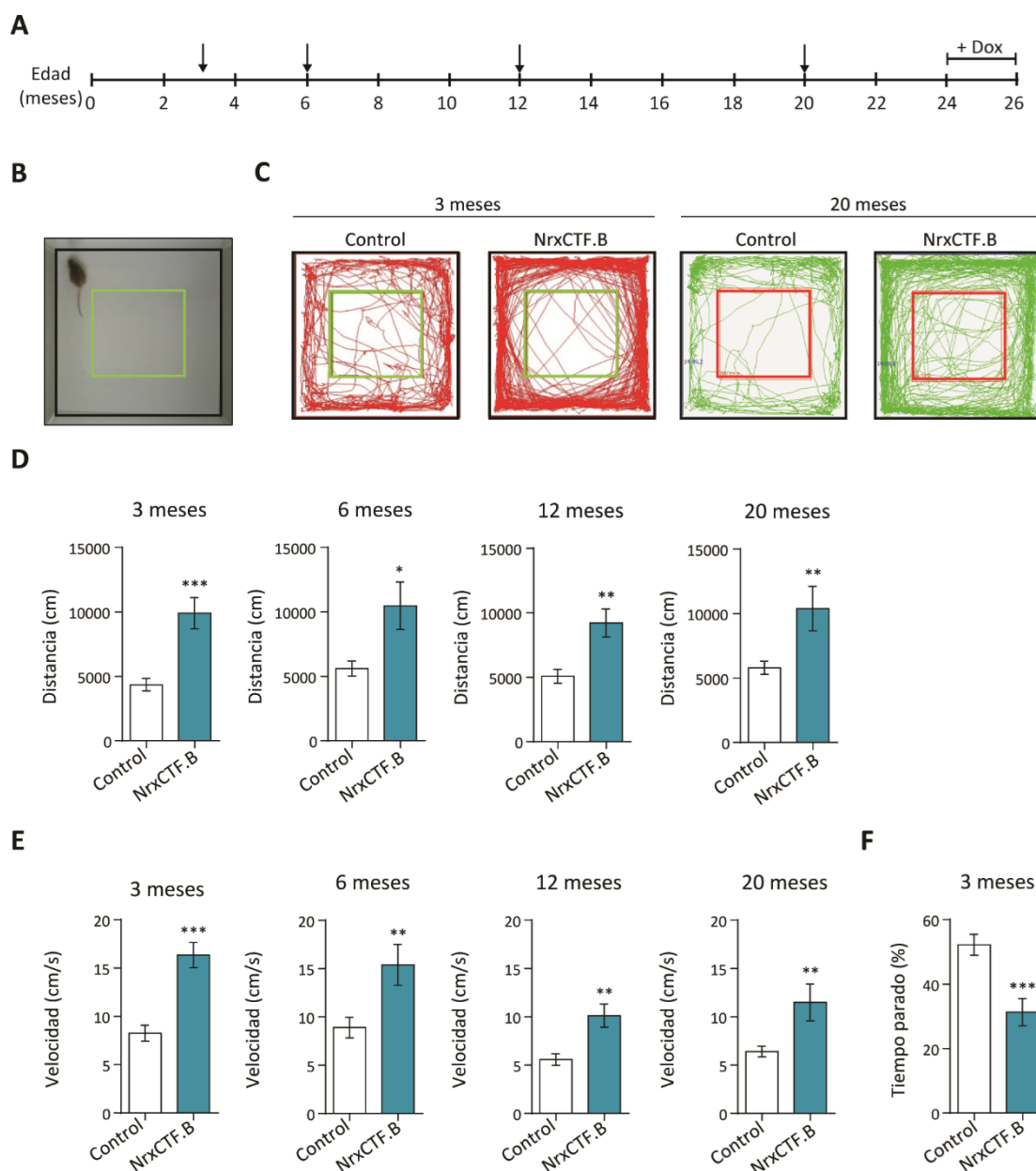
Para evaluar las funciones sensoriales autonómicas y musculares del ratón NrxCtf.B de expresión temprana, se realizaron una serie de pruebas primarias conocidas como batería de tests SHIRPA (Rogers et al., 1997) y recogidas en el apartado 7.2. de Materiales y Métodos de esta Tesis. En dicho análisis no se detectaron problemas asociados a los ratones dobles transgénicos NrxCtf.B al compararlos con sus controles hermanos de camada (no mostrado).

Las pruebas de análisis general SHIRPA se repitieron previamente a cada batería de test, asegurándonos así de que los animales no presentaban ningún problema que causara un perjuicio en la realización de las pruebas y, por tanto, que pudiera dar lugar a errores en la caracterización fenotípica de la población.

### 3.1.3. Análisis de locomoción exploratoria

#### 3.1.3.1. Test de campo abierto

En esta prueba, el ratón a analizar se introdujo en una caja vacía de 45 x 45 cm y paredes opacas de metacrilato por un tiempo limitado. Este espacio abierto, permitió evaluar distintos parámetros relacionados con la locomoción del animal y con la ansiedad. Relacionados con la locomoción se analizaron la distancia total recorrida y la velocidad, mientras que relacionados con la ansiedad se registraron datos como el tiempo de estancia en el área central de la caja (25 x 25 cm) (véase protocolo en apartado 7.3.1. Materiales y Métodos). El test se repitió a la misma población de ratones desde los 3 a los 20 meses. Observamos que los ratones NrxCtf.B recorrían una distancia dos veces superior a la recorrida por los ratones control. Este efecto se observó en cada uno de los tiempos analizados, 3, 6, 12 y 20 meses (3 meses, Control:  $4354.00 \pm 479.10$ ; NrxCtf.B:  $9900.00 \pm 1222.00$ ,  $p=0.0001$ . 6 meses, Control:  $5601.00 \pm 586.00$ ; NrxCtf.B:  $10480.00 \pm 1847.00$ ,  $p=0.0108$ . 12 meses, Control:  $5078.00 \pm 547.00$ ; NrxCtf.B:  $9214.00 \pm 1088.00$ ,  $p=0.0017$ . 20 meses, Control:  $5791.00 \pm 506.80$ ; NrxCtf.B:  $10391.00 \pm 1720.00$ ,  $p=0.0061$ . Unidades: cm) (Figura 43D). El aumento en la distancia recorrida por los ratones NrxCtf.B se acompañó de un aumento de dos veces en la velocidad media (3 meses, Control:  $8.25 \pm 0.83$ ; NrxCtf.B:  $16.35 \pm 1.31$ ,  $p<0.0001$ . 6 meses, Control:  $8.90 \pm 1.07$ ; NrxCtf.B:  $15.40 \pm 2.11$ ,  $p=0.0080$ . 12 meses, Control:  $5.58 \pm 0.60$ ; NrxCtf.B:  $10.12 \pm 1.19$ ,  $p=0.0017$ . 20 meses, Control:  $6.41 \pm 0.56$ ; NrxCtf.B:  $11.49 \pm 1.91$ ,  $p=0.0062$ . Unidades: cm/s) (Figura 43E). Asimismo, los ratones NrxCtf.B permanecieron menos tiempo parados que los ratones control, al menos a los 3 meses de edad, el único punto analizado (Control:  $52.23 \pm 3.23$ ; NrxCtf.B:  $31.28 \pm 4.22$ ,  $p=0.0006$ . Unidades: porcentaje de tiempo parado respecto del tiempo total de test) (Figura 43F).



**Figura 43. Test de campo abierto en la población NrxCtf.B de expresión temprana.** **A**, Esquema de realización del test a lo largo de la vida de la población. Edad: 3, 6, 12 y 20 meses. **B**, Vista aérea del test. **C**, Recorrido representativo del ratón control y del ratón NrxCtf.B a 3 y 20 meses de edad. **D**, Distancia total recorrida. **E**, Velocidad media. **F**, Porcentaje de tiempo total de duración del test que el ratón permanece parado a 3 meses de edad. N=12-15 ratones control; N=9-10 ratones NrxCtf.B. Análisis estadístico utilizado: *t*-test. *p* value: \**p*<0.05, \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001. Todas las barras de error son SEM. Test realizado por: 3 meses, FM; 6, 12, 20 meses, ACSH; extracción de datos y análisis de los datos en todos los casos: ACSH.

Por otro lado, debido a que los espacios abiertos generan ansiedad en los roedores, analizamos el número de entradas y el tiempo en el área central. En general no se observaron cambios en los ratones NrxCtf.B con respecto a los controles. El

número de entradas al centro no fue significativamente distinta a los 3, 6, 12 y 20 meses, observándose una tendencia al aumento en los ratones NrxCtf.B de 6, 12 y 20 meses (3 meses: Control:  $32.69 \pm 6.76$ , NrxCtf.B:  $30.80 \pm 7.12$ ,  $p=0.8507$ ; 6 meses: Control:  $41.25 \pm 6.12$ , NrxCtf.B:  $82.22 \pm 22.41$ ,  $p=0.0603$ ; 12 meses: Control:  $35.75 \pm 4.68$ , NrxCtf.B:  $61.89 \pm 15.52$ ,  $p=0.0851$ ; 20 meses: Control:  $39.80 \pm 5.80$ , NrxCtf.B:  $60.10 \pm 20.36$ ,  $p=0.2693$ ) (Figura 44A). El tiempo pasado en el centro fue similar entre los ratones control y los ratones NrxCtf.B, a excepción de una reducción a los 3 meses (3 meses, Control:  $4.78 \pm 0.82$ ; NrxCtf.B:  $2.26 \pm 0.45$ ,  $p=0.0218$ . 6 meses, Control:  $9.54 \pm 1.94$ ; NrxCtf.B:  $8.50 \pm 1.91$ ,  $p=0.7123$ . 12 meses, Control:  $5.68 \pm 0.54$ ; NrxCtf.B:  $8.02 \pm 1.60$ ,  $p=0.1370$ . 20 meses, Control:  $5.94 \pm 0.82$ ; NrxCtf.B:  $5.35 \pm 1.55$ ,  $p=0.7195$ . Unidades: porcentaje de tiempo en el centro respecto del total de duración del test) (Figura 44B).

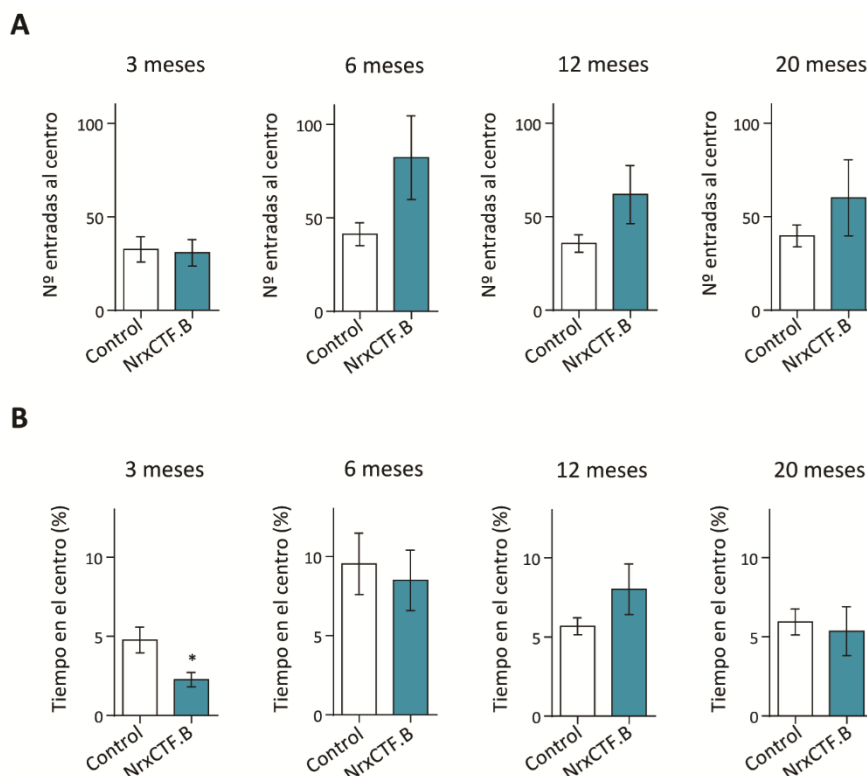
Estos datos sugieren que los ratones NrxCtf.B presentan hiperactividad motora en el test de campo abierto. Esta hiperactividad podría explicar la tendencia a incrementar el número de entradas al centro a partir de los 3 meses, que de esta forma normalizaría el tiempo total en el centro a pesar de la mayor velocidad que presentan los ratones NrxCtf.B.

La robustez de los valores en las repeticiones del test indica que el aumento en la actividad motora es un hecho que acontece y se mantiene a lo largo de la vida del animal, fruto de la expresión del transgén HA-NrxCtf en el cerebro.

### 3.1.3.2. Laberinto elevado en cruz

El laberinto elevado en cruz está conformado por cuatro brazos colocados en cruz, dos brazos abiertos enfrentados entre sí y dos cerrados enfrentados de igual forma. Los dos brazos abiertos crean un ambiente hostil para los roedores donde se sienten desprotegidos y los brazos cerrados otorgan un ambiente protector (protocolo en apartado 7.3.2. de Materiales y Métodos).





**Figura 44. Test de campo abierto en la población NrxCtf.B de expresión temprana.** **A**, Número de entradas a la zona central del campo abierto a 3, 6, 12 y 20 meses de edad en ratones NrxCtf.B de expresión temprana. **B**, Porcentaje de tiempo total que el animal pasa en la zona central del test. N=12-15 ratones control; N=9-10 ratones NrxCtf.B. Análisis estadístico utilizado: *t-test*. *p* value: \**p*<0.05. Todas las barras de error son SEM. Test realizado por: 3 meses: FM; 6, 12, 20 meses: ACSH; extracción y análisis de los datos: ACSH.

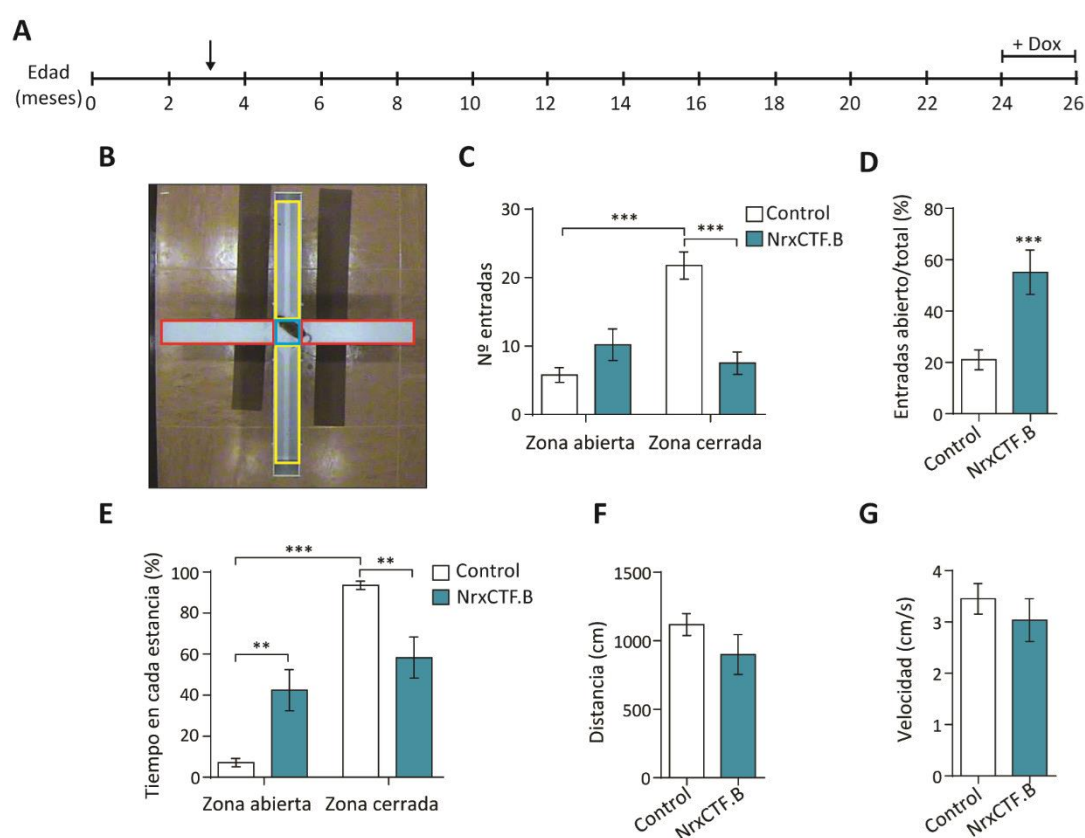
Este test se realizó en la población NrxCtf.B con expresión temprana del transgén a los 3 meses de edad. A diferencia de los ratones control que entran más a los brazos cerrados, el número de entradas a los brazos abiertos está incrementado en los ratones NrxCtf.B al mismo nivel que las entradas a los brazos cerrados (Control:  $21.05 \pm 3.85$ ; NrxCtf.B:  $55.15 \pm 8.66$ ,  $p=0.0008$ . Unidades: porcentaje de entradas en los brazos abiertos respecto del total de entradas) (Figura 45C,D). En ratones NrxCtf.B el tiempo de estancia en los brazos abiertos fue mayor en comparación con sus hermanos de camada control (Control:  $6.83 \pm 1.97$ ; NrxCtf.B:  $42.07 \pm 10.00$ ,  $p=0.0008$ . Unidades: porcentaje de tiempo en los brazos abiertos respecto del total). Los ratones control pasan un mayor tiempo de estancia en los brazos cerrados.

Los ratones NrxCtf.B presentan un tiempo de estancia similar en brazos abiertos

y cerrados mostrando la ausencia de preferencia por alguno de ellos. Sin embargo, los ratones control sí manifiestan una mayor preferencia por los brazos cerrados (Brazos abiertos, Control:  $6.83 \pm 1.97$ ; NrxCtf.B:  $42.07 \pm 10.00$ . Brazos cerrados, Control:  $93.17 \pm 1.97$ ; NrxCtf.B:  $57.93 \pm 10.00$ ;  $p < 0.0001$ . Unidades: porcentaje de tiempo en los brazos abiertos respecto del total) (Figura 45E).

Sin embargo, la distancia total recorrida (Control:  $1119.00 \pm 79.75$ ; NrxCtf.B:  $899.10 \pm 145.20$ ,  $p = 0.1743$ . Unidades: cm) (Figura 45F) y la velocidad (Control:  $3.45 \pm 0.30$ ; NrxCtf.B:  $3.04 \pm 0.42$ ,  $p = 0.4115$ . Unidades: cm/s) (Figura 45G) fueron similares en ratones control y ratones NrxCtf.B, posiblemente debido al espacio tan restringido para el movimiento de este test comparado con el test de campo abierto.

El incremento en el número de entradas y el tiempo transcurrido en los brazos abiertos, sin una afección en paralelo en parámetros motores, como distancia recorrida y velocidad, sugieren que los ratones NrxCtf.B presentan una menor aversión hacia los espacios abiertos.



**Figura 45. Laberinto elevado en cruz en la población NrxCtf.B de expresión temprana. A,** Esquema con los momentos de la vida de la población en los que se realizó el test. Edad: 3 (Continúa pie de figura→)

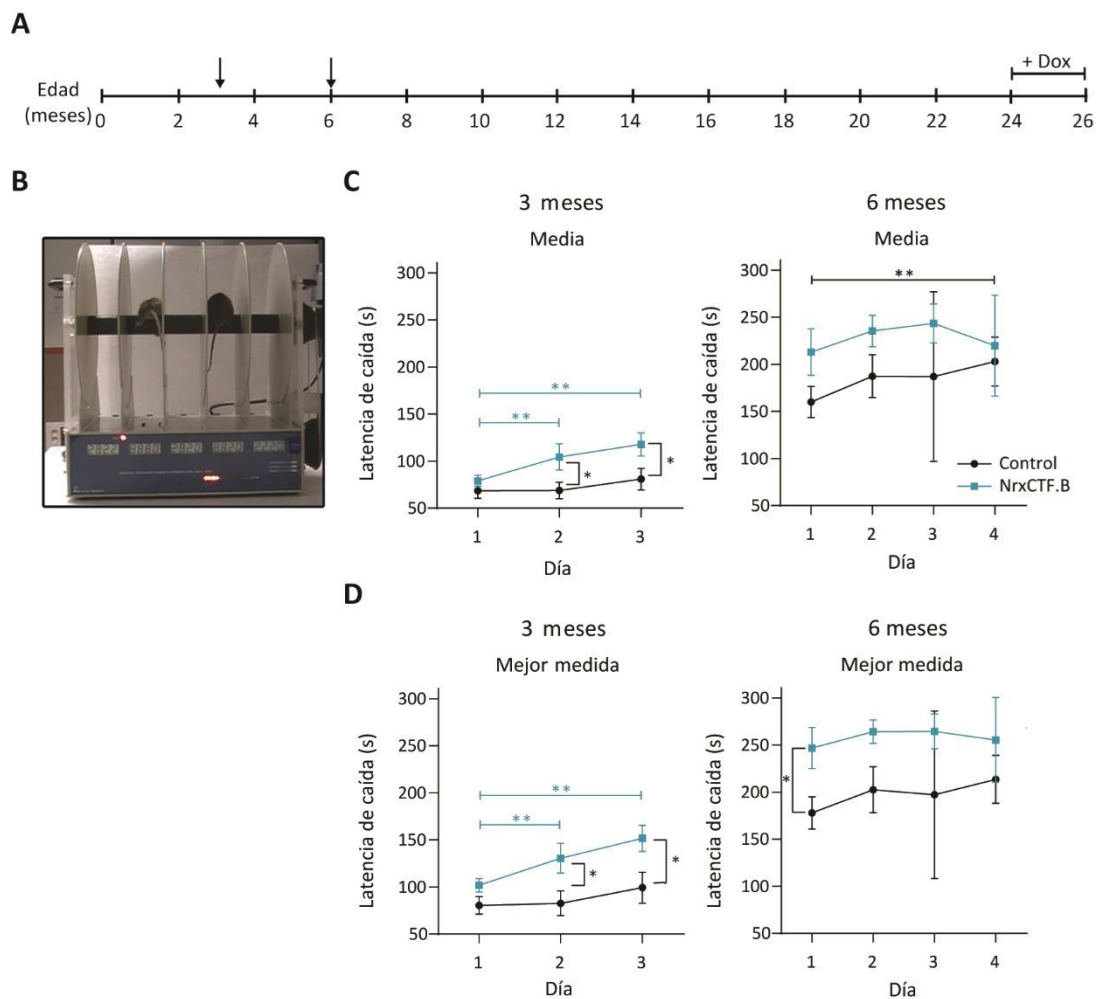
(← Continúa pie de figura) meses. **B**, Vista superior del test durante una sesión. Se representa la zona de análisis del test: en amarillo, brazos cerrados; en rojo, brazos abiertos; en azul, zona central. **C**, Número de entradas en la zona abierta y a la zona cerrada. **D**, Entradas en los brazos abiertos con respecto del total de entradas. Expresado en porcentaje del total de entradas. **E**, Porcentaje de tiempo total en la zona abierta y cerrada. **F**, Distancia total recorrida. **G**, Velocidad media. N=13 ratones control; N=10 ratones NrxCtf.B. Análisis estadístico utilizado: **C, E**, *one-way* ANOVA con *post-hoc* Bonferroni; **C, F, G**, *t-test*. *p*-value: \*\**p*<0.01; \*\*\**p*<0.001. Todas las barras de error son SEM. Test: FM; extracción de datos: FM y ACSH; análisis estadístico: ACSH.

### 3.1.4. Análisis de aprendizaje motor: *Rotarod*

En este test se coloca al ratón en una barra conectada a un motor giratorio que rota a una velocidad creciente desde 4 a 40 rpm. El aprendizaje motor del animal se evalúa mediante 2-3 ensayos cada día repetidos durante 3-4 días. El tiempo de permanencia de los ratones sobre el cilindro constituye una medida de su coordinación y aprendizaje motor. Se midió la latencia de caída del animal como el valor promedio de las repeticiones de cada día o como la mejor medida diaria (protocolo en 7.4. de Materiales y Métodos). Este test se realizó a la edad de 3 y 6 meses en esta población NrxCtf.B de expresión temprana.

Los resultados obtenidos mostraron una mayor latencia de caída en ratones NrxCtf.B con respecto a los controles, siendo significativo a los 3 meses de edad en los días 2 y 3 de test (3 meses, medida promedio, Día 1: Control:  $68.49 \pm 7.90$ ; NrxCtf.B:  $79.11 \pm 5.91$ , *p*=0.334. Día 2, Control:  $68.82 \pm 8.89$ ; NrxCtf.B:  $104.44 \pm 13.88$ , *p*=0.034. Día 3, Control:  $80.90 \pm 11.39$ ; NrxCtf.B:  $117.78 \pm 12.18$ , *p*=0.043. Mejor medida, Día 1, Control:  $80.54 \pm 9.21$ ; NrxCtf.B:  $102.00 \pm 7.21$ , *p*=0.105. Día 2: Control:  $82.69 \pm 13.04$ ; NrxCtf.B:  $130.67 \pm 15.74$ , *p*=0.017. Día 3, Control:  $99.31 \pm 16.40$ ; NrxCtf.B:  $151.67 \pm 13.82$ , *p*=0.017. Unidades: s) (Figura 46C,D). A 3 meses, los ratones NrxCtf.B muestran una mejora diaria significativa en la latencia de caída, mientras los controles presentaron una tendencia que no alcanzaba significancia. A la edad de 6 meses los ratones control presentaron una mejora significativa entre el primer y el cuarto día del test, mientras los ratones NrxCtf.B presentaron tiempos de latencia incrementados que no aumentaban más con las repeticiones del test (6 meses, Medida promedio, Día 1, Control:  $159.96 \pm$

16.49; NrxCtf.B:  $213.00 \pm 24.72$ ,  $p=0.079$ . Día 2, Control:  $187.38 \pm 22.72$ ; NrxCtf.B:  $235.39 \pm 16.66$ ,  $p=0.126$ . Día 3, Control:  $186.96 \pm 90.01$ ; NrxCtf.B:  $243.39 \pm 20.63$ ,  $p=0.123$ . Día 4, Control:  $203.00 \pm 25.86$ ; NrxCtf.B:  $219.89 \pm 45.14$ ,  $p=0.623$ . Mejor medida, Día 1, Control:  $177.92 \pm 17.03$ ; NrxCtf.B:  $246.78 \pm 21.71$ ,  $p=0.020$ . Día 2, Control:  $202.58 \pm 24.47$ ; NrxCtf.B:  $264.11 \pm 12.49$ ,  $p=0.057$ . Día 3, Control:  $197.17 \pm 88.87$ ; NrxCtf.B:  $264.33 \pm 18.44$ ,  $p=0.061$ . Día 4, Control:  $213.58 \pm 25.58$ ; NrxCtf.B:  $255.44 \pm 45.14$ ,  $p=0.212$ . Unidades: s) (Figura 46C,D). Aunque la interpretación de este test presentó limitaciones debido a la mejora no significativa del grupo control a 3 meses, los resultados apuntan a un aumento en la latencia de caída en los ratones NrxCtf.B. El hecho de que las repeticiones del test produzcan un incremento en la latencia de caída en los ratones NrxCtf.B sólo a 3 meses se podría deber a un “efecto techo” a los 6 meses.



**Figura 46. Test de Rotarod en la población NrxCtf.B de expresión temprana. A,** Esquema donde se representan las edades a las que se realizó el test. Edad 3 y 6 meses. **B,** Imagen (Continúa pie de figura →)

(← Continúa pie de figura) del test *Rotarod* durante la realización del mismo. **C**, Latencia de caída media de los ensayos por día de la población a los 3 y 6 meses. **D**, Latencia de caída de la mejor medida del total de ensayos de cada día. N=12-13 ratones control; N=9-10 ratones NrxCtf.B. Análisis estadístico utilizado: *two-way* ANOVA con *post-hoc* Bonferroni. *p* value: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ . Todas las barras de error son SEM. Test y extracción de datos, 3 meses: FM; 6 meses: ACSH. Análisis estadístico, 3 y 6 meses: ACSH.

### 3.1.5. Análisis de patrones repetitivos de comportamiento: test de acicalamiento

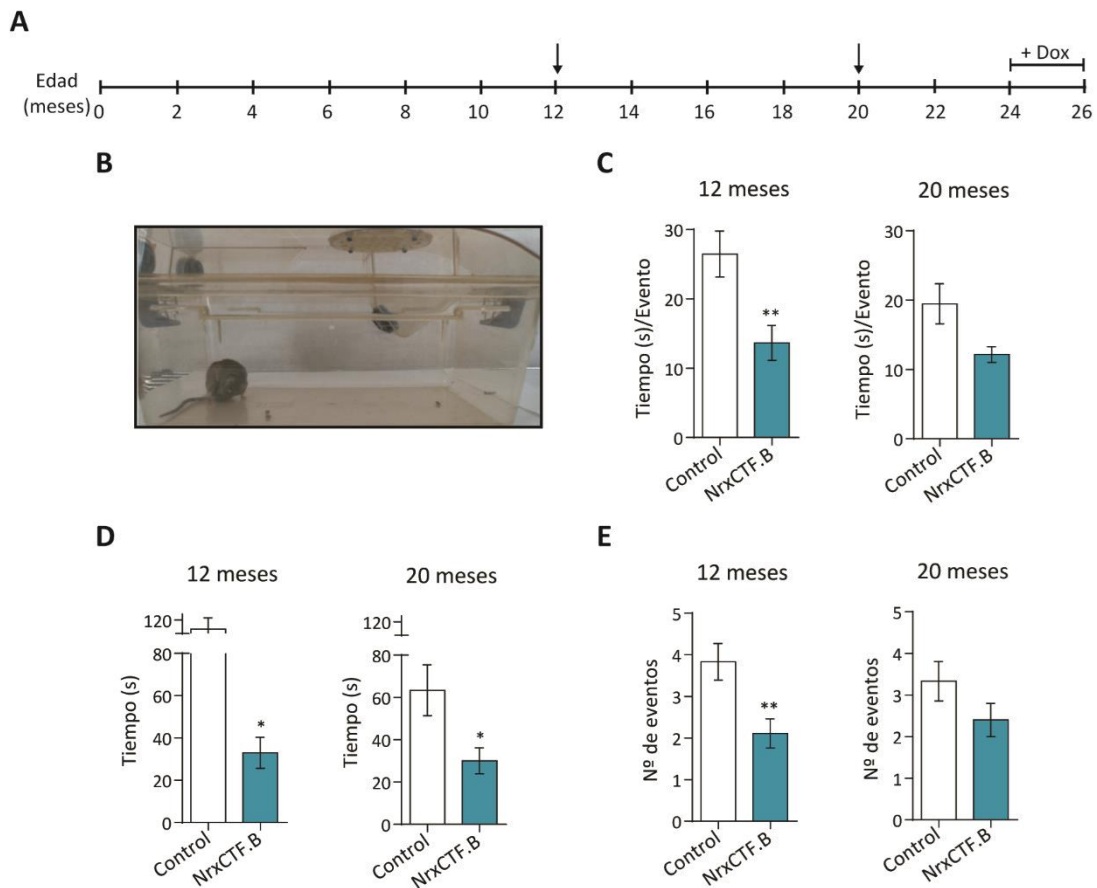
En el test de acicalamiento (*self-grooming*) se cuantificó el tiempo que los ratones invierten realizando secuencias estereotipadas de acicalamiento y el número de eventos realizados. Un decremento de tiempo o eventos de acicalamiento denota una pérdida de estereotipias en el ratón.

Este test se realizó a los 12 y 20 meses de edad. El ratón NrxCtf.B de expresión temprana presenta un decremento tanto en tiempo (12 meses, Control:  $103.15 \pm 20.90$ ; NrxCtf.B:  $33.01 \pm 7.34$ ,  $p=0.016$ . 20 meses: Control:  $63.43 \pm 12.00$ ; NrxCtf.B:  $30.05 \pm 6.19$ ,  $p=0.0436$ . Unidades: s) (Figura 47D) como en número de eventos (12 meses, Control:  $3.83 \pm 0.44$ ; NrxCtf.B:  $2.11 \pm 0.35$ ,  $p=0.009$ . 20 meses, Control:  $3.33 \pm 0.47$ ; NrxCtf.B:  $2.40 \pm 0.40$ ,  $p=0.176$ ) (Figura 47E) de acicalamiento con respecto a los observados en los ratones control. También se detectó una reducción en el tiempo por evento de acicalamiento de los ratones NrxCtf.B en las dos edades ensayadas (12 meses, Control:  $26.47 \pm 3.31$ ; NrxCtf.B:  $13.64 \pm 2.51$ ,  $p=0.009$ . 20 meses: Control:  $19.45 \pm 2.89$ ; NrxCtf.B:  $12.14 \pm 1.12$ ,  $p=0.064$ . Unidades: s) (Figura 47C). Los resultados de este ensayo sugieren que los ratones NrxCtf.B reducen la frecuencia y la duración de comportamientos estereotipados como el acicalamiento.

### 3.1.6. Evaluación de la memoria

Dentro del contexto de la AD, la evaluación de la memoria de los ratones NrxCtf.B era un aspecto importante. Para ello, se realizaron diversas pruebas a lo largo de la vida del animal, desde los 3 a los 20 meses, en las que se evaluó memoria a corto (MCP) y largo plazo (MLP) de diferentes tipos de memoria: memoria de trabajo, memoria

contextual y memoria emocional.

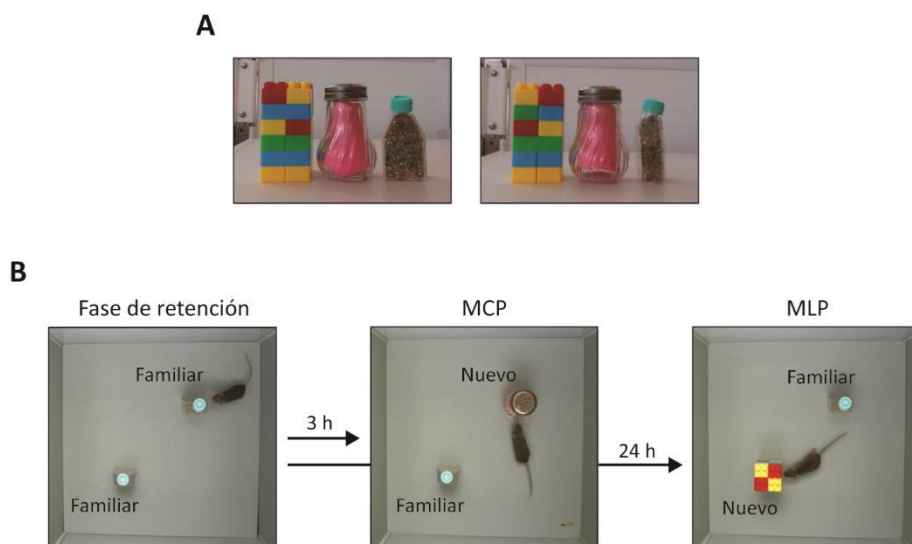


**Figura 47. Test de *self-grooming*.** **A**, Esquema de las edades a las que se realizó este test a la población de comportamiento. Edad: 12 y 20 meses. **B**, Fotografía de un ratón acicalándose durante el test. **C**, Cuantificación del tiempo promedio de la duración de un evento de acicalamiento. **D**, Cuantificación del tiempo total promedio de acicalamiento. **E**, Cuantificación promedio del número de eventos de acicalamiento. N=12-15 ratones control; N= 9-10 ratones NrxCTF.B. Análisis estadístico utilizado: *t*-test. *p* value: \**p*<0.05; \*\**p*<0.01. Todas las barras de error son SEM. Test, extracción de datos y análisis de datos: ACSH.

### 3.1.6.1. Memoria de reconocimiento de un nuevo objeto

El test de reconocimiento de un nuevo objeto evalúa la memoria de reconocimiento de objetos a corto (3 horas) y largo plazo (24 horas) sin necesidad de la presencia de componentes estresantes o aversivos para el animal, sino que se basa en la preferencia innata por la novedad en los roedores (Vogel-Ciernia y Wood, 2014).

Al inicio de esta prueba al ratón se le presentan dos objetos iguales, que pasaran a denominarse como objeto familiar. A las 3 horas (MCP), se cambia uno de estos objetos por otro objeto nuevo, de características diferentes en tamaño, forma y textura. A las 24 horas (MLP), el objeto nuevo se reemplaza por otro diferente, manteniéndose siempre el primer objeto familiar (Figura 48) (protocolo en apartado 7.6.1. de Materiales y Métodos).



**Figura 48. Objetos usados en el test de reconocimiento de nuevo objeto. A,** Vista frontal y lateral de los objetos usados. **B,** Visión superior del test en cada fase del mismo. MCP: Memoria a corto plazo, MLP: Memoria a largo plazo.

La prueba de reconocimiento de un objeto nuevo se realizó a los 3, 6, 12 y 20 meses de vida de los ratones. Los ratones control y NrxCtf.B presentaron un índice de memoria a corto y largo plazo similar, detectada como un mayor tiempo de interacción con el objeto nuevo (60% nuevo vs 40% familiar), a excepción de a 3 meses de edad donde los ratones NrxCtf.B presentaron el mismo tiempo de interacción con el objeto nuevo que con el familiar (3 meses, MCP, Control:  $72.31 \pm 2.62$ ; NrxCtf.B:  $49.75 \pm 6.95$ ,  $p=0.003$ . MLP, Control:  $63.40 \pm 3.80$ ; NrxCtf.B:  $45.06 \pm 4.58$ ,  $p=0.006$ . 6 meses, MCP, Control:  $56.75 \pm 4.48$ ; NrxCtf.B:  $66.13 \pm 3.81$ ,  $p=0.144$ . 12 meses, MCP, Control:  $58.59 \pm 2.99$ ; NrxCtf.B:  $51.52 \pm 4.84$ ,  $p=0.2075$ . MLP, Control:  $62.78 \pm 3.25$ ; NrxCtf.B:  $60.04 \pm 4.73$ ,  $p=0.6268$ . 20 meses, MCP, Control:  $52.03 \pm 3.29$ ; NrxCtf.B:  $55.74 \pm 5.56$ ,  $p=0.5463$ . MLP, Control:  $57.34 \pm 2.49$ ; NrxCtf.B:  $53.84 \pm 2.72$ ,  $p=0.3626$ . Unidades: porcentaje de tiempo de interacción con el objeto nuevo respecto a la interacción total durante el test)

(Figura 49B,D). Con respecto a la interacción total con los objetos, ambos grupos presentaron unos tiempos totales de interacción similares, salvo un incremento a 3 meses, en los distintos momentos ensayados (3 meses, MCP, Control:  $56.12 \pm 8.08$ ; NrxCTF.B:  $110.20 \pm 23.77$ ,  $p=0.023$ . MLP, Control:  $62.01 \pm 9.46$ ; NrxCTF.B:  $101.90 \pm 17.66$ ,  $p=0.043$ . 6 meses, MCP, Control:  $66.06 \pm 7.91$ ; NrxCTF.B:  $58.88 \pm 9.35$ ,  $p=0.563$ . 12 meses, MLP, Control:  $50.46 \pm 6.76$ ; NrxCTF.B:  $51.72 \pm 8.38$ ,  $p=0.9064$ . MLP, Control:  $34.78 \pm 5.98$ ; NrxCTF.B:  $33.62 \pm 6.97$ ,  $p=0.9006$ . 20 meses, MCP, Control:  $50.69 \pm 5.87$ ; NrxCTF.B:  $86.36 \pm 9.73$ ,  $p=0.0028$ . MLP, Control:  $43.91 \pm 5.97$ ; NrxCTF.B:  $66.33 \pm 13.44$ ,  $p=0.1009$ . Unidades: porcentaje de tiempo de interacción total) (Figura 49C,E).

Para probar que los ratones no tenían preferencia por uno u otro objeto, se analizó el tiempo de interacción por cada tipo de objeto. Este análisis resultó en ausencia de preferencia por la forma, textura o color de los distintos objetos usados, por tanto, los objetos empleados no afectaron a los resultados del test.

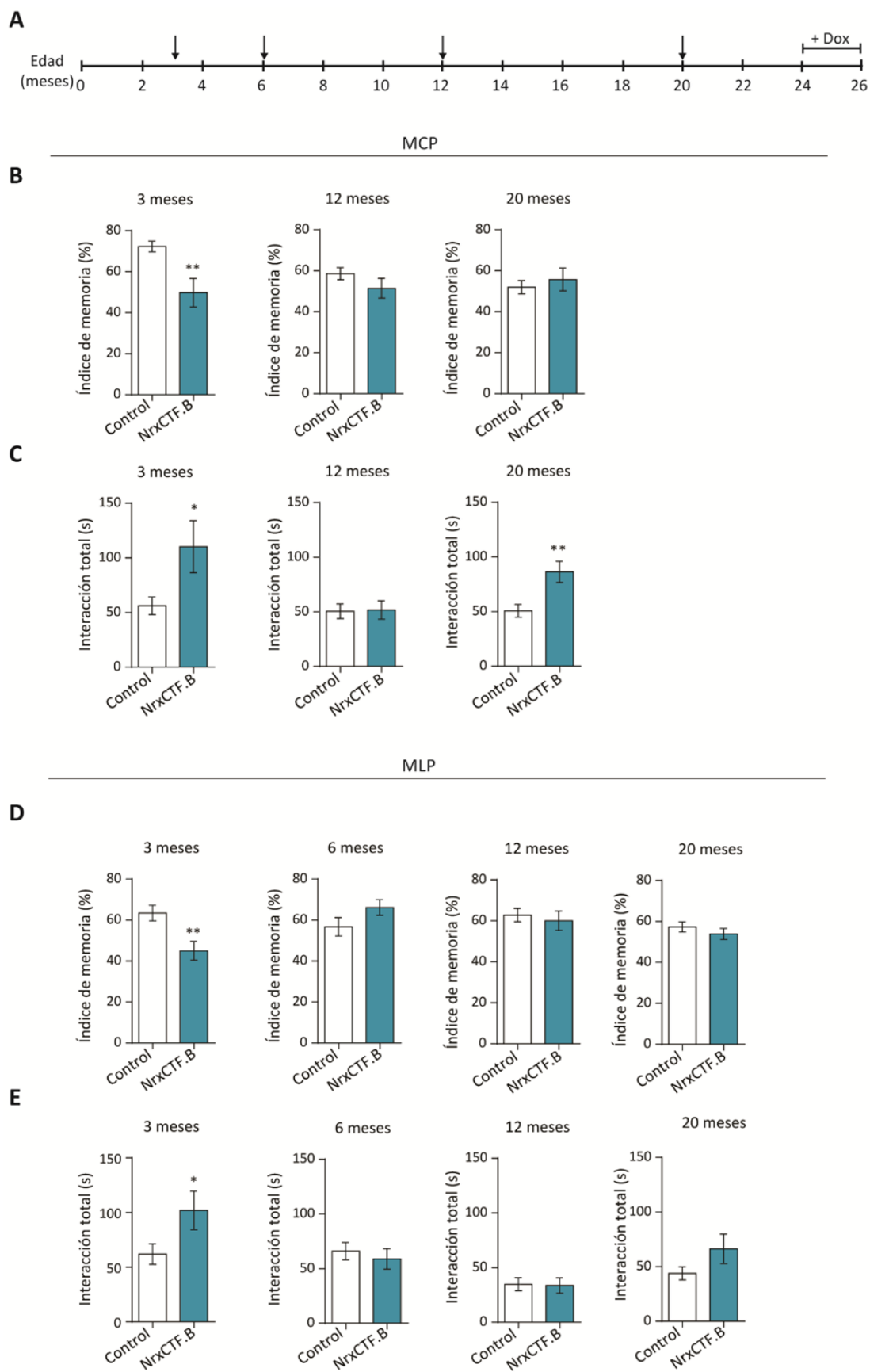
Los resultados obtenidos a partir de este test mostraron que no existen defectos en MCP ni MLP a lo largo de la vida del animal, al menos mediante la evaluación de memoria con el test de reconocimiento de un nuevo objeto.

### 3.1.6.2. Evitación pasiva

El paradigma de la evitación pasiva se usa habitualmente como una manera de testar la memoria contextual a corto y largo plazo. Esta prueba induce en el roedor un conflicto entre su preferencia innata por las zonas oscuras y la relación con un estímulo aversivo recibido con anterioridad en esa misma zona. De manera que la evitación o el aumento en la latencia de entrada en la zona oscura donde el ratón recibió el estímulo aversivo se interpreta como el establecimiento de memoria contextual.

Este test se realiza en una caja dividida en dos compartimentos de plexiglás, uno oscuro y otro iluminado, ambos conectados por una puerta corredera de apertura controlada remotamente. La rejilla del suelo está conectada a un administrador de descargas que controla la duración y la intensidad de descarga. Tras una fase de habituación en la que se permite el animal la exploración de la habitación iluminada, se





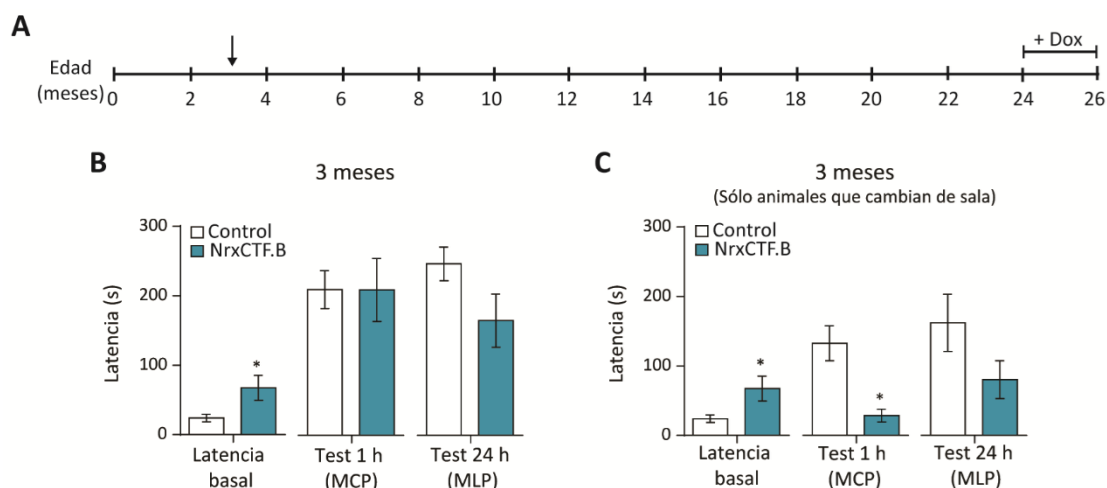
**Figura 49. Prueba de memoria de reconocimiento de objetos en una población NrxCTF.B de expresión temprana. A,** Esquema de las edades a las que se realizó el test. (Continúa pie de figura →)

(← Continúa pie de figura) Edad: 3, 6, 12 y 20 meses. **B**, Índice de memoria a corto plazo (3 horas). **C**, Índice de exploración a corto plazo. Suma de la interacción total con los dos objetos. **D**, Índice de memoria a largo plazo (24 horas). **E**, Índice de exploración a largo plazo. N=12-13 ratones control; N=9-10 ratones NrxCtf.B. Análisis estadístico: *t-test*. *p* value: \**p*<0.05; \*\**p*<0.01. Todas las barras de error son SEM. Test realizado por, 3 meses: FM; 6, 12, 20 meses: ACSH. Extracción de datos: 3 meses: FM y ACSH; 6, 12, 20 meses: ACSH. Análisis de datos en todos los casos: ACSH.

produce la apertura de la puerta corredera. El ratón penetra en la habitación oscura con un tiempo de latencia basal, donde se le proporciona una descarga de 0.2 mA que provoca en el animal una aversión hacia ese contexto. A las 3 y a las 24 horas se coloca al animal en la habitación iluminada durante 5 minutos manteniendo la puerta divisoria abierta y se mide el tiempo de latencia de paso a la habitación oscura. Sometimos a esta prueba de comportamiento a los ratones control y NrxCtf.B de 3 meses de edad. En todos los ratones se midió la latencia del animal para cruzar a la habitación oscura en las fases de habituación, de MCP y de MLP. A aquellos ratones que no penetraron en la habitación oscura durante los 5 minutos de las fases de MCP y MLP se les otorgó el valor máximo de latencia (300 s) (ver protocolo en apartado 7.6.2. de Materiales y métodos).

Los resultados mostraron que los ratones NrxCtf presentan una latencia basal durante el condicionamiento superior al doble que los controles (Latencia basal, Control:  $23.95 \pm 5.35$ ; NrxCtf.B:  $62.38 \pm 16.73$ ,  $p=0.0241$ . Unidades: s), posiblemente debido a la menor aversión por los espacios abiertos de los ratones NrxCtf.B (Figura 50B). A pesar de ello, la latencia de entrada durante las fases de MCP y MLP no presentó diferencias significativas entre ambos grupos de animales, aunque los ratones NrxCtf.B mostraron una tendencia no significativa en la MLP (MCP, Control:  $209.90 \pm 27.27$ ; NrxCtf.B:  $209.5 \pm 45.34$ ,  $p=0.9936$ . MLP, Control:  $247.00 \pm 24.35$ ; NrxCtf.B:  $165.40 \pm 38.35$ ,  $p=0.0734$ . Unidades: s). Para poder evaluar la latencia de entrada de aquellos ratones que sí cambian de habitación, re-analizamos los datos seleccionando aquellos animales que cambiaron de compartimento durante el tiempo limitado de duración del test. En este caso, observamos una reducción en los tiempos de latencia en la MCP y MLP que adquirió valores significativos en la MCP (MCP, Control:  $132.60 \pm 25.06$ ; NrxCtf.B:  $28.43 \pm 9.35$ ,  $p=0.0314$ . MLP, Control:  $162.10 \pm 41.20$ ; NrxCtf.B:  $80.32 \pm 27.29$ ,  $p=0.1365$ . Unidades: s) (Figura 50C). Los resultados obtenidos sugieren que si tenemos en cuenta

sólo los ratones que cruzan al compartimento donde recibieron el estímulo aversivo, los ratones NrxCtf.B de 3 meses podrían presentar indicios de una menor memoria contextual. Además, se muestra que la menor latencia en el cambio de compartimento no es debida a la alta actividad motora de los ratones NrxCtf.B mostrada en experimentos anteriores, ya que la latencia basal durante el condicionamiento es mayor en ratones NrxCtf.B que en ratones control.



**Figura 50. Test de evitación pasiva en la población NrxCtf.B de expresión temprana.** **A**, Esquema de los momentos en los que se hizo este test a esta población. Edad: 20 meses. **B**, Latencia de entrada al compartimento oscuro del total de la población. **C**, Latencia de entrada al compartimento oscuro teniendo en cuenta sólo aquellos animales que cambian de habitación. MCP: memoria corto plazo (3h), MLP: memoria largo plazo (24h). N= 13 ratones control, N=10 ratones NrxCtf.B. En C la N se ve reducida a N=7 control, N=3 NrxCtf.B en MCP y N=5 control, N=5 NrxCtf.B en MLP. Test estadístico: *t*-test. *p*-value: \**p*<0,05. Todas las barras de error están en SEM. Test y extracción de datos: FM; Análisis de datos: ACSH.

### 3.1.6.3. Evitación activa

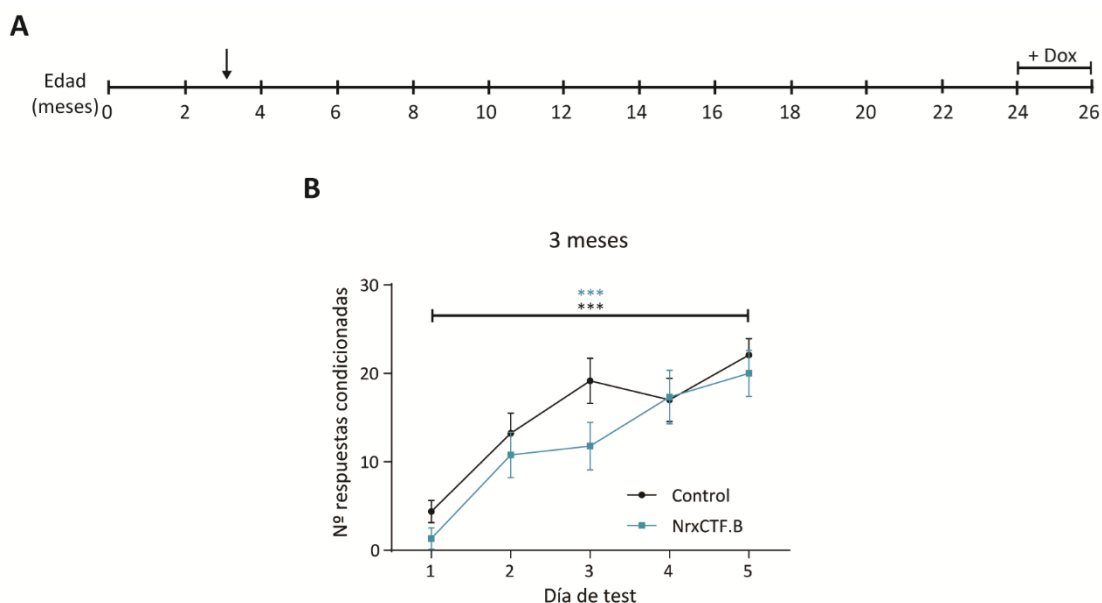
En el paradigma de evitación activa los roedores aprenden a asociar un estímulo neutro con un estímulo aversivo y generan una respuesta locomotriz de evitación. Este test se emplea para evaluar aprendizaje asociativo y la memoria emocional fundamentalmente. Para ello se coloca al animal en una jaula de dos compartimentos de iguales características. Éstos deben aprender la asociación entre un estímulo neutro (luz y sonido) y un estímulo aversivo (descarga eléctrica). Esta prueba consta de la consecución de 4 sesiones de condicionamiento y una sesión de test (día 5). En cada una

de las 5 sesiones se realiza un protocolo de 30 repeticiones consecutivas. En cada una de estas repeticiones se expone al animal al estímulo neutro durante 5 segundos, seguido inmediatamente de una descarga eléctrica que se presenta junto con el estímulo neutro durante 25 segundos adicionales o hasta que el animal cambia de compartimento. Los tipos de respuesta esperada son: respuesta condicionada, el animal cambia de compartimento antes de la descarga eléctrica; respuesta no condicionada, el animal cambia de compartimento tras la descarga; respuesta nula, el ratón no cambia de compartimento (protocolo en el apartado 7.6.3. de Materiales y métodos).

La realización de este test a los 3 meses de edad mostró que el número de respuestas condicionadas aumentan de forma similar en los ratones control y NrxCtf.B (Día 1, Control:  $4.38 \pm 1.21$ ; NrxCtf.B:  $1.56 \pm 0.52$ ,  $p=0.1342$ . Día 2, Control:  $13.23 \pm 3.67$ , NrxCtf.B:  $10.78 \pm 3.59$ ,  $p=0.4880$ . Día 3, Control:  $19.15 \pm 5.31$ ; NrxCtf.B:  $11.78 \pm 3.93$ ,  $p=0.0667$ . Día 4, Control:  $17.00 \pm 4.71$ ; NrxCtf.B:  $17.33 \pm 5.78$ ,  $p=0.9320$ . Día 5, Control:  $22.08 \pm 6.12$ ; NrxCtf.B:  $20.00 \pm 6.67$ ,  $p=0.5119$ ) (Figura 51). Por tanto, los resultados obtenidos que los ratones NrxCtf.B a 3 meses de edad no presentaban defectos en el aprendizaje asociativo y en memoria emocional.

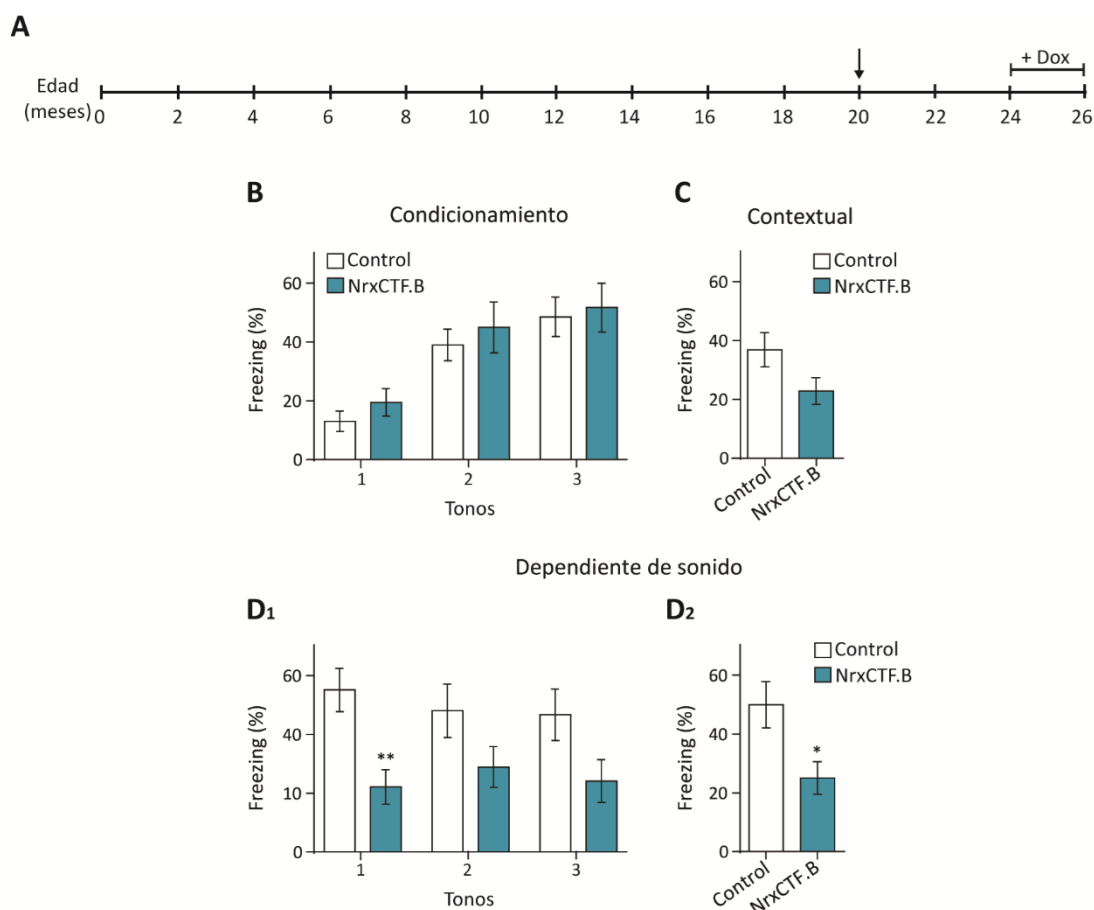
#### 3.1.6.4. Condicionamiento al miedo

Esta prueba es realizada para evaluar memoria contextual, aprendizaje asociativo entre un estímulo neutro y uno aversivo, y memoria emocional. En una primera fase de condicionamiento el animal se mantiene en un compartimento durante 2 minutos. Tras este tiempo recibe un estímulo sonoro de 30 segundos, acompañado en los últimos 5 segundos por descarga eléctrica, repitiéndose la presentación de este par de estímulos tres veces consecutivas. A las 24 horas se coloca al animal durante 5 minutos en el mismo contexto pero sin recibir ningún tipo de estímulo. Inmediatamente, se cambia el contexto del habitáculo, se reintroduce al animal y se le somete a las mismas tres presentaciones del estímulo sonoro pero sin descarga eléctrica. El tiempo de ausencia de movimientos (*freezing*) se cuantifica en cada ratón durante la habituación, la exposición al mismo contexto y al estímulo sonoro (protocolo en apartado 7.6.4. de Materiales y Métodos).



**Figura 51. Test de evitación activa.** **A**, Esquema de los momentos de la vida de la población en la que se realizó el test. **B**, Cuantificación del número de respuestas condicionadas. N=12 ratones control, N=9 ratones NrxCTF.B. Análisis estadístico: two-WAY ANOVA de medidas repetidas, *post-hoc* Bonferroni. p-value: \*\*\*p<0.0001. Todas las barras de error son SEM. Test y extracción de datos: FM; Análisis de datos: ACSH.

Realizamos esta prueba en la población de animales de expresión temprana de la línea NrxCTF.B a los 20 meses de edad. El tiempo de *freezing* basal (representado en Figura 52B, tono 1) no presentó cambios entre los ratones control y NrxCTF.B (Control:  $13.05 \pm 3.46$ ; NrxCTF.B:  $19.46 \pm 4.67$ ,  $p=0.2732$ . Unidades: porcentaje de tiempo de *freezing* del total previo al choque eléctrico (25s)). La cuantificación del tiempo de *freezing* durante la fase del test dependiente de contexto mostró una tendencia hacia un menor *freezing* (38% menos) de los ratones NrxCTF.B con respecto a los controles (Control:  $36.92 \pm 5.82$ ; NrxCTF.B:  $22.90 \pm 4.52$ ,  $p=0.0936$ . Unidades: porcentaje de tiempo de *freezing* del total de la duración del test) (Figura 52C). Con respecto a la fase del test dependiente del estímulo sonoro observamos un tiempo de *freezing* significativamente menor en los ratones NrxCTF.B de 20 meses (50% menos) que sus hermanos controles (Control:  $49.96 \pm 7.84$ ; NrxCTF.B:  $25.05 \pm 5.52$ ,  $p=0.0282$ . Unidades: porcentaje de tiempo de *freezing* del total de la duración del test) (Figura 52D). Estos resultados evidenciaron deterioro en la memoria emocional, aprendizaje asociativo y memoria contextual en ratones NrxCTF.B de 20 meses.

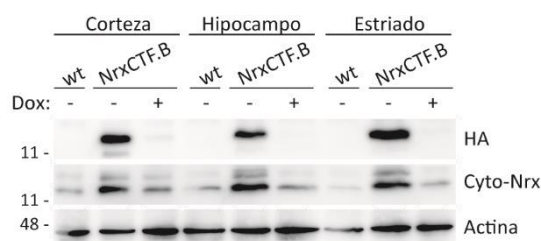


**Figura 52. Prueba de condicionamiento al miedo en una población NrxCtf.B de expresión temprana. A,** Esquema de los momentos de la vida de esta población en los que se realizó el test. Edad: 20 meses. **B,** Fase de condicionamiento. El tono 1 de esta fase se considera como *freezing* basal, ya que es el propio del animal antes de haber recibido ningún estímulo aversivo. **C,** Cuantificación del *freezing* total en la fase de test de memoria contextual. **D, D<sub>1</sub>,** Cuantificación del *freezing* del animal en los tonos 1, 2, 3 y **D<sub>2</sub>,** *freezing* total en las 3 repeticiones (tonos 1+2+3) durante la fase de test dependiente de sonido. N=13 controles, N=9 dobles transgénicos NrxCtf.B. Análisis estadístico: *t*-test. *p*-value: \**p*<0.05, \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001. Todas las barras de error son SEM. Test realizado por FM. Extracción de datos: CMC. Análisis de datos: ACSH.

### 3.1.7. Análisis del comportamiento en la línea NrxCtf.B con expresión temprana de HA-NrxCtf tras el tratamiento con Dox

Tras realizar esta batería de test de comportamiento a los ratones control y a los ratones NrxCtf.B de expresión temprana, decidimos evaluar en esta misma población los efectos del apagado del transgén HA-NrxCtf. Para ello, los ratones control y NrxCtf se alimentaron con Dox y se realizaron diferentes pruebas de comportamiento que se

iniciaron a los 25 días de tratamiento y se extendieron durante 30 días adicionales, manteniendo siempre la dieta con Dox. La inhibición de la expresión de HA-NrxCTF en la distintas regiones cerebrales se confirmó por *Western blot* en ratones NrxCTF.B de la misma edad tratados en paralelo a los animales de la población de comportamiento (Figura 53).



**Figura 53. Apagado de la expresión tras el tratamiento con Dox mediante *Western blot*.** Se analizaron los niveles de expresión con los anticuerpos anti-HA y anti-Cyto-Nrx.

Para la realización de las pruebas, se seleccionaron aquéllas en las que habíamos obtenido resultados relevantes en locomoción (test de campo abierto), estereotipias (test de acicalamiento) y memoria (prueba de condicionamiento al miedo). Para intentar evitar un efecto de la repetición en la prueba de condicionamiento al miedo, se modificó el contexto y la intensidad y frecuencia del sonido (detallado en apartado 7.6.4. de Materiales y Métodos).

La mayor actividad motora de los ratones NrxCTF.B con respecto a los controles se mantuvo tras el tratamiento con Dox, mostrando un aumento al doble en la distancia recorrida (Control:  $3822 \pm 585.80$ ; NrxCTF.B:  $9411 \pm 1676$ ,  $p=0.0023$ . Unidades: cm) y en velocidad media (Control:  $4.23 \pm 0.65$ ; NrxCTF.B:  $10.43 \pm 1.86$ ,  $p=0.0023$ . Unidades: cm/s) (Figura 54B). El número de entradas (Control:  $27.58 \pm 6.43$ ; NrxCTF.B:  $54.11 \pm 18.80$ ,  $p=0.1523$ ) y el tiempo de estancia en la zona central del test (Control:  $4.93 \pm 1.11$ ; NrxCTF.B:  $7.68 \pm 1.89$ ,  $p=0.2008$ . Unidades: porcentaje de tiempo del total de la duración del test en la zona central) mostraron una tendencia al incremento en los ratones NrxCTF.B (Figura 54B).

Con respecto al test de acicalamiento, se observó una tendencia al descenso en el tiempo total y en el tiempo por evento, así como una normalización en el número de eventos en los ratones NrxCTF.B respecto a los ratones control (Figura 54C). Al comparar

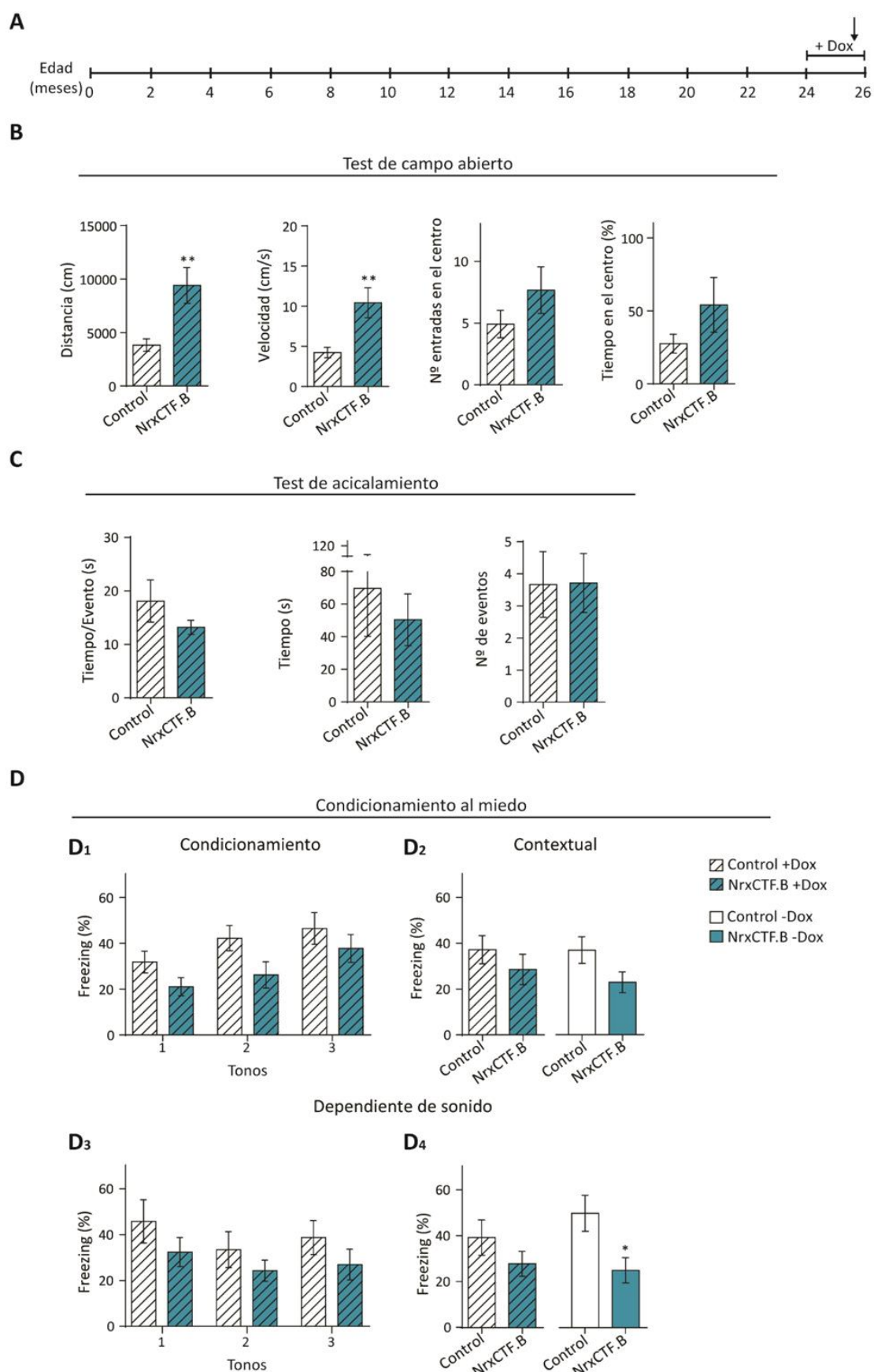
estos datos con los datos obtenidos de ratones de 20 meses, el punto ensayado más cercano previo al tratamiento, observamos valores similares en los ratones control (Figura 47). Sin embargo, las diferencias de los ratones NrxCtf.B tratados con Dox respecto a los controles fueron de menor magnitud tras el tratamiento (Figura 54C).

La repetición del test de condicionamiento al miedo tras el tratamiento con Dox mostró valores similares de *freezing* en los ratones control y NrxCtf durante el condicionamiento (latencia basal, Control:  $31.88 \pm 4.74$ ; NrxCtf.B:  $21.06 \pm 3.99$ ,  $p=0.1068$ . Unidades: porcentaje de *freezing* del tiempo total previo al choque (25s)). En la fase de memoria contextual, no hubo diferencias significativas entre los ratones control y NrxCtf.B, aunque se mantuvo la misma tendencia a la reducción previa al tratamiento (Control:  $37.18 \pm 6.15$ ; NrxCtf.B:  $28.54 \pm 6.62$ ,  $p=0.3527$ . Unidades: porcentaje de *freezing* del tiempo total de estímulo sonoro) (Figura R33D). Además, el porcentaje de *freezing* fue similar en ambos grupos respecto a la misma fase previa al tratamiento con Dox. En la fase de test dependiente de sonido obtuvimos que los ratones NrxCtf.B presentaron una tendencia a la reducción en el porcentaje de *freezing* respecto al de sus hermanos control, sin alcanzar significancia (Control:  $39.34 \pm 7.68$ ; NrxCtf.B:  $27.89 \pm 5.74$ ,  $p=0.2605$ . Unidades: porcentaje de tiempo total de estímulo sonoro). Al comparar estos valores con los obtenidos en la misma fase antes de tratamiento, se observó que no había diferencias significativas entre los animales antes y después del tratamiento con Dox. Estos datos iniciales sugieren que la resolución del acúmulo de NrxCtf en edades avanzadas no supone una mejora en los distintos aspectos estudiados.

### 3.1.8. Resumen del comportamiento de la línea NrxCtf.B de expresión temprana de HA-NrxCtf

A continuación se exponen de manera resumida los datos obtenidos a lo largo del tiempo en las pruebas más relevantes realizadas en la población NrxCtf.B de expresión temprana (Figura 55). Los datos obtenidos a partir de la realización de esta batería de pruebas indicaron que la expresión de NrxCtf en el cerebro desde las etapas más iniciales del desarrollo favorece la aparición de alta locomoción en el ratón, una reducción en el tiempo de acicalamiento, un mayor tiempo en los brazos abiertos del





**Figura 54. Batería de test realizada a la población NrxCTF.B de expresión temprana tras el tratamiento con Dox. A,** Esquema de los momentos de la vida de esta población en los que (Continúa pie de figura →)

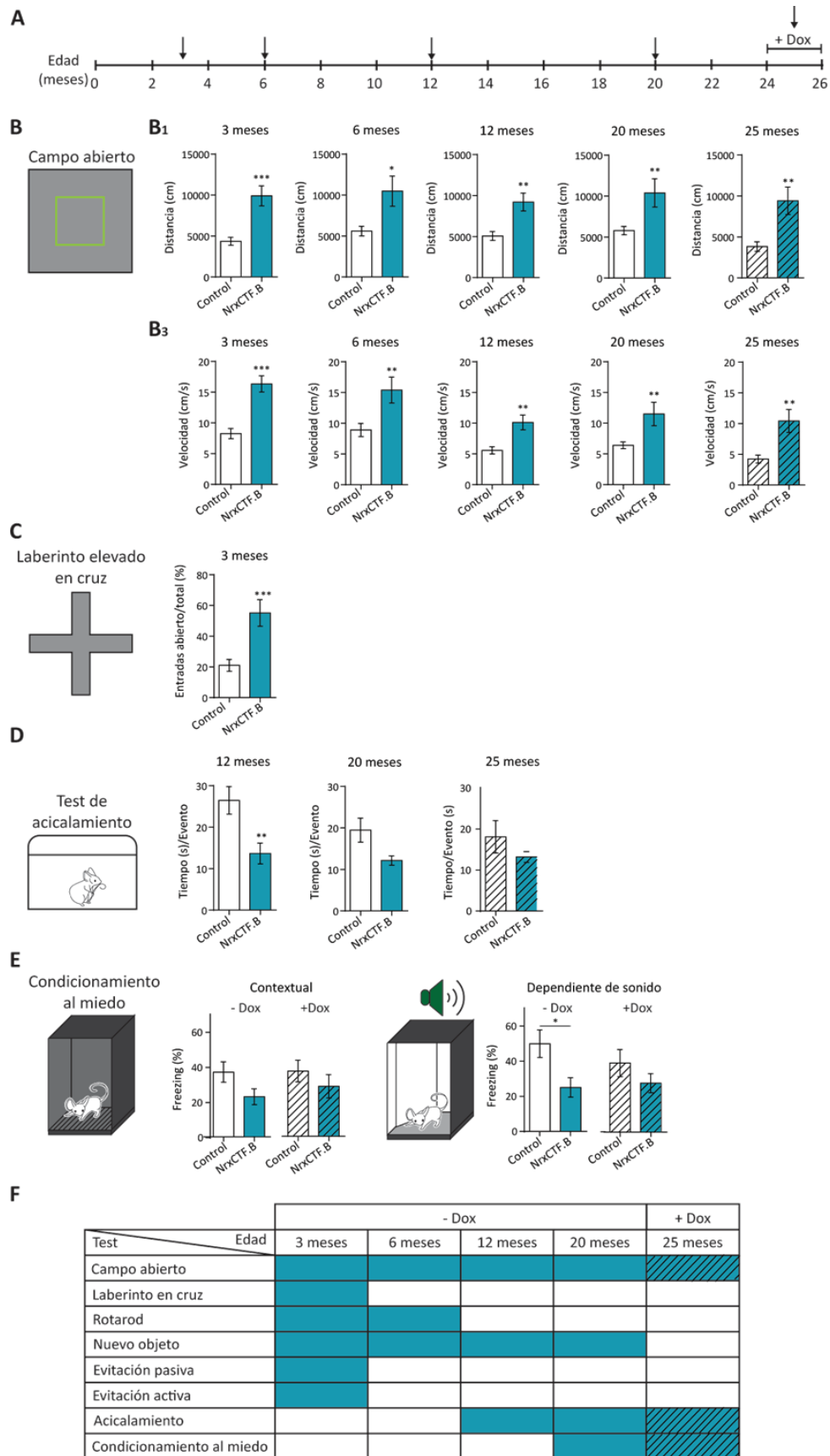
(←Continúa pie de figura) se realizaron los tests. Edad: 25 meses. **B**, Test de campo abierto. De izquierda a derecha: cuantificación de la distancia total recorrida, de la velocidad media, del número de entradas a la zona central del test y del porcentaje de tiempo pasado en la zona central respecto de la duración total del test. **C**, Prueba de acicalamiento. De izquierda a derecha: cuantificación del tiempo de acicalamiento por evento, cuantificación del tiempo y cuantificación del número de eventos de acicalamiento ocurridos durante el test. **D**, Prueba de condicionamiento al miedo. **D<sub>1</sub>**, Cuantificación del *freezing* durante la fase de condicionamiento. **D<sub>2</sub>**, Cuantificación del *freezing* durante la fase dependiente de contexto comparado con el *freezing* presentado antes del tratamiento con Dox. **D<sub>3</sub>**, Cuantificación del *freezing* del animal en los tonos 1, 2, 3 en la fase de test dependiente de sonido. **D<sub>4</sub>**, *Freezing* total en las 3 repeticiones (tonos 1+2+3) durante la fase de test dependiente de sonido comparado con el *freezing* presentado antes del tratamiento con Dox. N=11 controles, N=9 dobles transgénicos NrxCtf.B. Análisis estadístico: *t-test*. *p*-value:  $p^* < 0.05$ . Todas las barras de error son SEM. Test de campo abierto y de acicalamiento: Realizado por: ACSH, Extracción y análisis de datos: ACSH. Condicionamiento al miedo: Realizado por: FM, Extracción de datos: CMC, Análisis de datos: ACSH.

laberinto elevado en cruz y defectos en la memoria dependiente del sonido evaluada en el test de condicionamiento al miedo. Sin embargo, los ratones no presentaron defectos en MCP y MLP en el test de reconocimiento de objetos. En ratones envejecidos, el tratamiento de Dox no produce una mejora en las pruebas evaluadas a pesar del apagado efectivo del acúmulo de NrxCtf.

### 3.2. Caracterización fenotípica del comportamiento en la línea NrxCtf.B con expresión adulta de HA-NrxCtf

#### 3.2.1. Cohorte de animales para comportamiento

En todas las pruebas de comportamiento que se exponen a continuación utilizamos una población común de la línea NrxCtf.B de inicio de expresión adulta ( $P > 30$ ). Los grupos experimentales estaban compuestos de 10-12 ratones control y 10 ratones NrxCtf.B. Esta población de ratones se caracterizó fenotípicamente en varios puntos de su vida desde los 3 hasta los 16 meses de edad. El rango de edad de la población fue de 3 meses. Para poder comparar entre experimentos, las pruebas realizadas en esta población de animales siguieron el mismo protocolo que las realizadas



**Figura 55. Tabla resumen de los test de mayor relevancia realizados en la población NrxCTF.B de expresión temprana. A, Momentos de la vida de la población en la que se realizó (Continúa pie de figura →)**

(← Continúa pie de figura) algún test. **B**, Distancia y velocidad en el Test de campo abierto a 3, 6, 12, 20 (sin tratamiento con Dox) y 25 meses (con tratamiento con Dox). **C**, Entradas en brazos abiertos del total de entradas (%) del laberinto elevado en cruz a 3 meses. **D**, Tiempo invertido por evento de acicalamiento en el test de acicalamiento. **E**, Porcentaje de *freezing* dependiente de contexto y de sonido en la prueba de condicionamiento al miedo. **F**, Tabla resumen de los test que se realizaron a cada edad a la población de ratones.

para la caracterización fenotípica de la población NrxCtf.B de expresión temprana. El objetivo general de estos experimentos fue doble. Por una parte, determinar si los efectos producidos por NrxCtf en la vida adulta dependían del momento de inicio de su acúmulo. En segundo lugar, nos interesó determinar la posible existencia de una fase asintomática tras iniciar el acúmulo de NrxCtf en el cerebro adulto.

### 3.2.2. Evaluación general del estado del animal

Al igual que con la población NrxCtf.B de expresión temprana, las funciones sensoriales autonómicas y musculares del ratón se evaluaron por una batería de pruebas primarias SHIRPA (Rogers et al., 1997) recogidas en el apartado 7.2. de Materiales y Métodos de esta Tesis Doctoral. En dicho análisis no se detectaron problemas asociados a los ratones control o a los ratones NrxCtf.B de expresión adulta.

### 3.2.3. Análisis de locomoción exploratoria

#### 3.2.3.1. Test de campo abierto

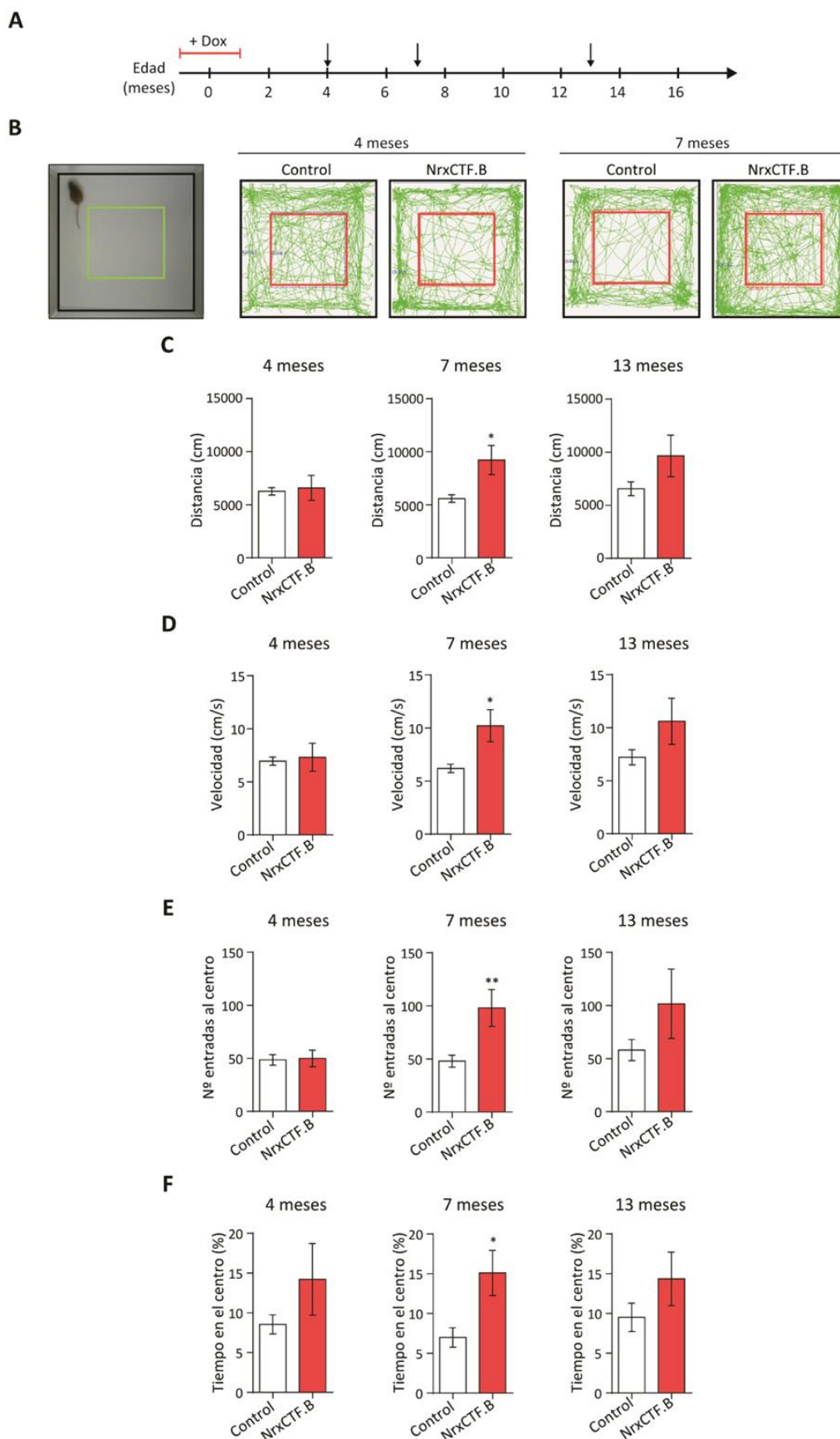
En el análisis de este test en la población NrxCtf.B de expresión adulta no observamos diferencias entre grupos en ninguno de los parámetros evaluados a los 4 meses de edad, pero sí aparecieron diferencias en animales de 7 meses de edad. Los ratones NrxCtf.B de 7 meses presentaron un aumento significativo de 1.65 veces en distancia (4 meses, Control:  $6263 \pm 342.70$ ; NrxCtf.B:  $6588 \pm 1181$ ,  $p=0.7779$ . 7 meses, Control:  $5593 \pm 352$ ; NrxCtf.B:  $9227 \pm 1367$ ,  $p=0.0112$ . Unidades: cm) y un aumento similar de 1.65 veces en la velocidad (4 meses, Control:  $6.96 \pm 0.38$ ; NrxCtf.B:  $7.32 \pm 1.32$ ,  $p=0.7780$ . 7 meses, Control:  $6.20 \pm 0.39$ ; NrxCtf.B:  $10.22 \pm 1.52$ ,  $p=0.0115$ .

Unidades: cm/s) (Figura 56C,D) con respecto a sus controles. Cuando se evaluó a la población a 13 meses de edad se observó una tendencia al incremento en la distancia y velocidad de los ratones NrxCtf.B (Distancia, Control:  $6554 \pm 650$ ; NrxCtf.B:  $9652 \pm 1958$ ,  $p=0.1351$ . Unidades: cm. Velocidad, Control:  $7.20 \pm 0.72$ ; NrxCtf.B:  $10.60 \pm 2.17$ ,  $p=0.1380$ . Unidades: cm/s). Con respecto a las visitas a la zona central del test y el tiempo de estancia en este área, a los 4 meses no hubo diferencias entre grupos, pero sí aparecieron a partir de los 7 meses (Visitas a la zona central: 4 meses, Control:  $48.50 \pm 4.94$ ; NrxCtf.B:  $50.00 \pm 7.75$ ,  $p=0.8677$ . 7 meses, Control:  $47.83 \pm 5.72$ ; NrxCtf.B:  $98.10 \pm 17.41$ ,  $p=0.0078$ . 13 meses, Control:  $58.00 \pm 9.87$ ; NrxCtf.B:  $101.7 \pm 32.64$ ,  $p=0.1978$ . Tiempo en el centro: 4 meses, Control:  $8.55 \pm 1.20$ ; NrxCtf.B:  $14.21 \pm 4.50$ ,  $p=0.2024$ . 7 meses, Control:  $7.00 \pm 1.23$ ; NrxCtf.B:  $15.11 \pm 2.83$ ,  $p=0.0113$ . 13 meses, Control:  $9.51 \pm 1.79$ ; NrxCtf.B:  $14.35 \pm 3.37$ ,  $p=0.2096$ . Unidades: porcentaje de tiempo en la zona central respecto de la duración total del test) (Figura 56E,F). Mientras los animales control mantuvieron valores parecidos en distancia recorrida y velocidad a 4, 7 y 13 meses, los ratones NrxCtf.B presentaron a 7 meses un aumento de 1.4 veces en distancia y velocidad con respecto a los valores que ellos mismos presentaron a 4 meses de edad (Figura 56C,D). Debido a que los ratones NrxCtf.B de expresión adulta comienzan a acumular NrxCtf en el cerebro a partir del segundo mes de vida, estos datos indican una fase asintomática de al menos 3 meses que precede a la hiperactividad motora de estos animales.

Estos resultados apuntan a que el tratamiento con Dox para apagar la expresión de HA-NrxCtf en la edad más temprana del desarrollo tiene como consecuencia un retraso en la aparición del fenotipo de alta actividad característico de los ratones NrxCtf.B con expresión temprana (Figura 43).

### 3.2.3.2. Laberinto elevado en cruz

Esta prueba se realizó a los 16 meses de edad en la población NrxCtf.B de inicio de la expresión adulta. Como era de esperar, los ratones control entraron más veces en los brazos cerrados del test. Sin embargo, los ratones NrxCtf.B perdieron esa preferencia y presentaron un número de entradas similar a los brazos abiertos y cerrados del mismo (Control:  $37.46 \pm 4.74$ ; NrxCtf.B:  $50.59 \pm 5.04$ ,  $p=0.0720$ . Unidades:



**Figura 56. Test de campo abierto en población de expresión adulta de NrxCtf.B.** **A**, Esquema donde se representa los puntos de edad a los que se realizó el test (4, 7 y 13 meses). (Continúa pie de figura →)

(← Continúa pie de figura) **B**, Vista superior del test y recorrido representativo de un ratón control y un ratón NrxCtf.B a los 4 y 7 meses. **C**, Distancia total recorrida. **D**, Velocidad media. **E**, Cuantificación del número de entradas a la zona central (25 x 25 cm). **F**, Tiempo de estancia en la zona central en porcentaje de tiempo total. N=10-12 ratones control, N=10 ratones NrxCtf.B. Test estadístico: t-test. *p* value: \**p*<0.05. Todas las barras de error son SEM. Test, extracción y análisis de datos: ACSH.

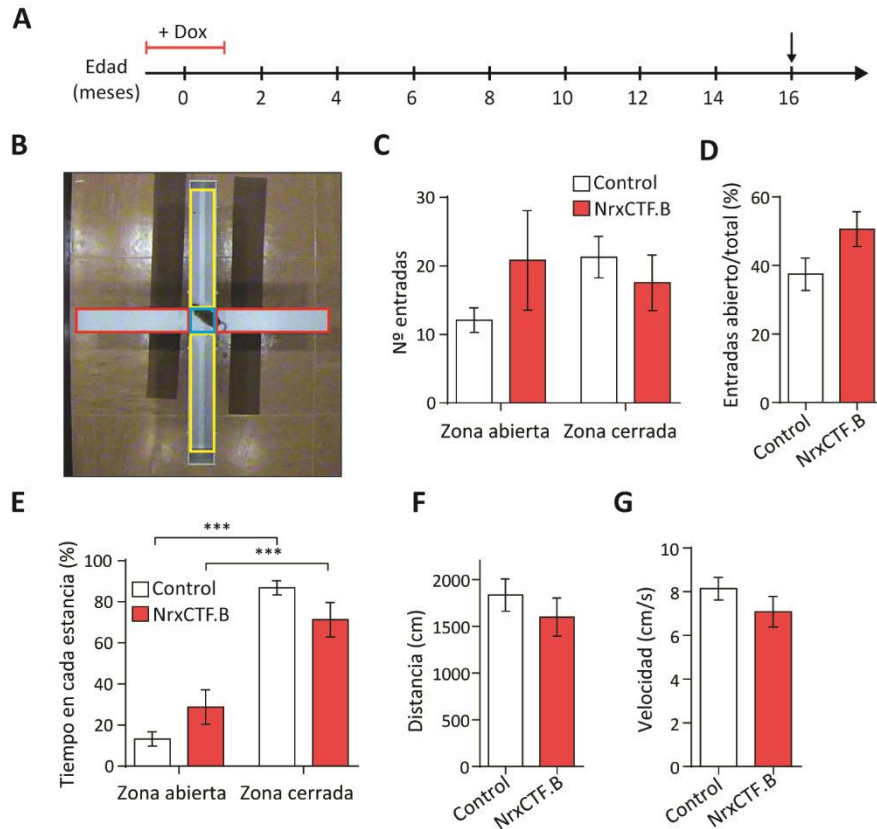
porcentaje de entradas en los brazos abiertos respecto del total de entradas) (Figura 57C,D). Con respecto al tiempo de permanencia en cada una de las estancias del test (zona abierta vs zona cerrada), en los ratones NrxCtf.B se observó un incremento no significativo cercano al doble en el tiempo de estancia en los brazos abiertos respecto de sus hermanos de camada control (Control:  $13.23 \pm 3.46$ ; NrxCtf.B:  $28.79 \pm 8.37$ , *p*=0.1012. Unidades: porcentaje de tiempo en los brazos abiertos respecto de la duración total del test) (Figura 57E). Mientras que los ratones control pasaron 6.6 veces más tiempo en los brazos cerrados que en los abiertos, los ratones NrxCtf.B sólo pasan 2.5 veces más en esa estancia (Control, brazos abiertos:  $13.23 \pm 3.46$ ; brazos cerrados:  $86.77 \pm 3.46$ , *p*<0.0001. NrxCtf, brazos abiertos:  $28.79 \pm 8.37$ ; brazos cerrados:  $71.21 \pm 8.37$ , *p*=0.0019. Unidades: porcentaje de tiempo en los brazos abiertos/cerrados con respecto de la duración total del test) (Figura 57E). Por otro lado, la distancia total recorrida (Control:  $1835.00 \pm 173.00$ ; NrxCtf.B:  $1599.00 \pm 203.00$ , *p*=0.3869. Unidades: cm) (Figura 57F) fue similar en ratones control y NrxCtf.B, al igual que la velocidad media (Control:  $8.14 \pm 0.52$ ; NrxCtf.B:  $7.08 \pm 0.70$ , *p*=0.2383. Unidades: cm/s) (Figura 57G).

Los resultados de este test sugieren que la expresión exclusiva de HA-NrxCtf en el cerebro adulto reproduce, al menos en parte, la menor aversión por los espacios asociada con la expresión temprana.

### 3.2.4. Análisis de aprendizaje motor: *Rotarod*

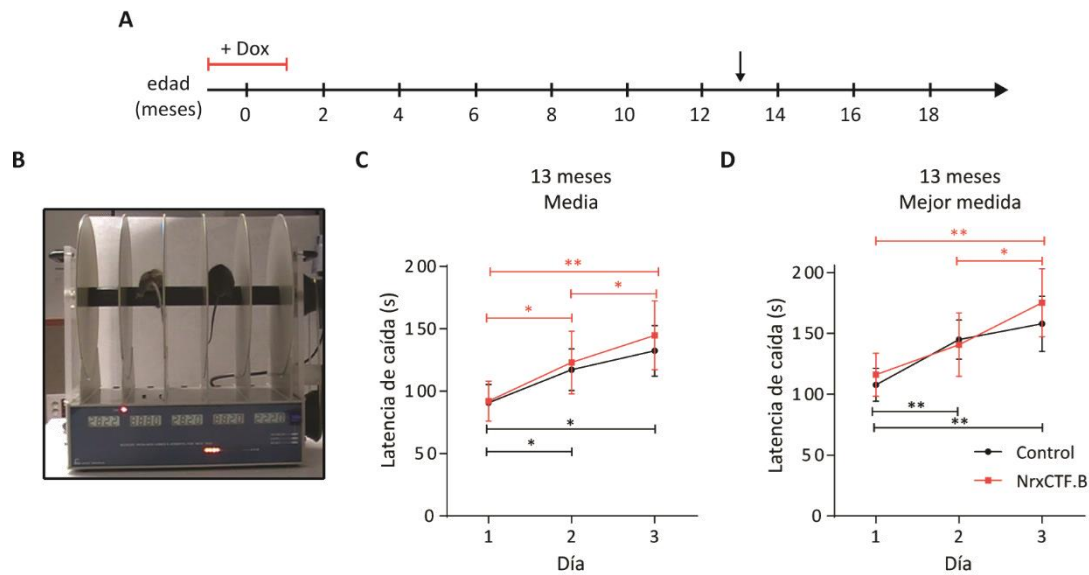
Este test se realizó a la edad de 13 meses. Se observaron tiempos de latencia de caída en cada día de ensayo y de mejora con las repeticiones similares en los grupos de ratones control y NrxCtf.B (Medida promedio, Día 1, Control:  $90.75 \pm 14.65$ ; NrxCtf.B:  $92.03 \pm 16.02$ , *p*=0.953. Día 2, Control:  $117.31 \pm 16.68$ ; NrxCtf.B:  $123.00 \pm 25.04$ , *p*=0.847. Día

3, Control:  $132.36 \pm 20.25$ ; NrxCtf.B:  $144.80 \pm 27.62$ ,  $p=.715$ . Mejor medida, Día 1, Control:  $107.75 \pm 13.61$ ; NrxCtf.B:  $116.00 \pm 17.67$ ,  $p=0.711$ . Día 2, Control:  $145.00 \pm 16.09$ ; NrxCtf.B:  $140.70 \pm 26.07$ ,  $p=0.886$ . Día 3, Control:  $157.92 \pm 22.63$ ; NrxCtf.B:  $140.70 \pm 26.07$ ,  $p=0.632$ . Unidades: s) (Figura 58). Por tanto, la expresión adulta de HA-NrxCtf no produjo cambios detectables en el aprendizaje motor de los ratones.



**Figura 57. Laberinto elevado en cruz en la población NrxCtf.B de expresión adulta.** **A**, Esquema con los momentos de la vida de la población en los que se realizó el test, 16 meses. **B**, Vista superior del test. Se representa la zona de análisis del test: en amarillo, brazos cerrados; en rojo, brazos abiertos; en azul, zona central. **C**, Cuantificación del número de entradas en la zona abierta y en la zona cerrada. **D**, Entradas en los brazos abiertos con respecto del total de entradas. Expresado en % del total de entradas. **E**, Tiempo en la zona abierta y en la zona cerrada. Expresado en % del tiempo total en las dos zonas. **F**, Distancia total recorrida. **G**, Velocidad media. N=11 ratones control; N=11 ratones NrxCtf.B. Análisis estadístico utilizado: *one-way* ANOVA con *post-hoc* Bonferroni (C, E), *t-test* (D,F,G). Todas las barras de error son SEM. Test y extracción de datos: CMC. Análisis estadístico: CMC y ACSH.

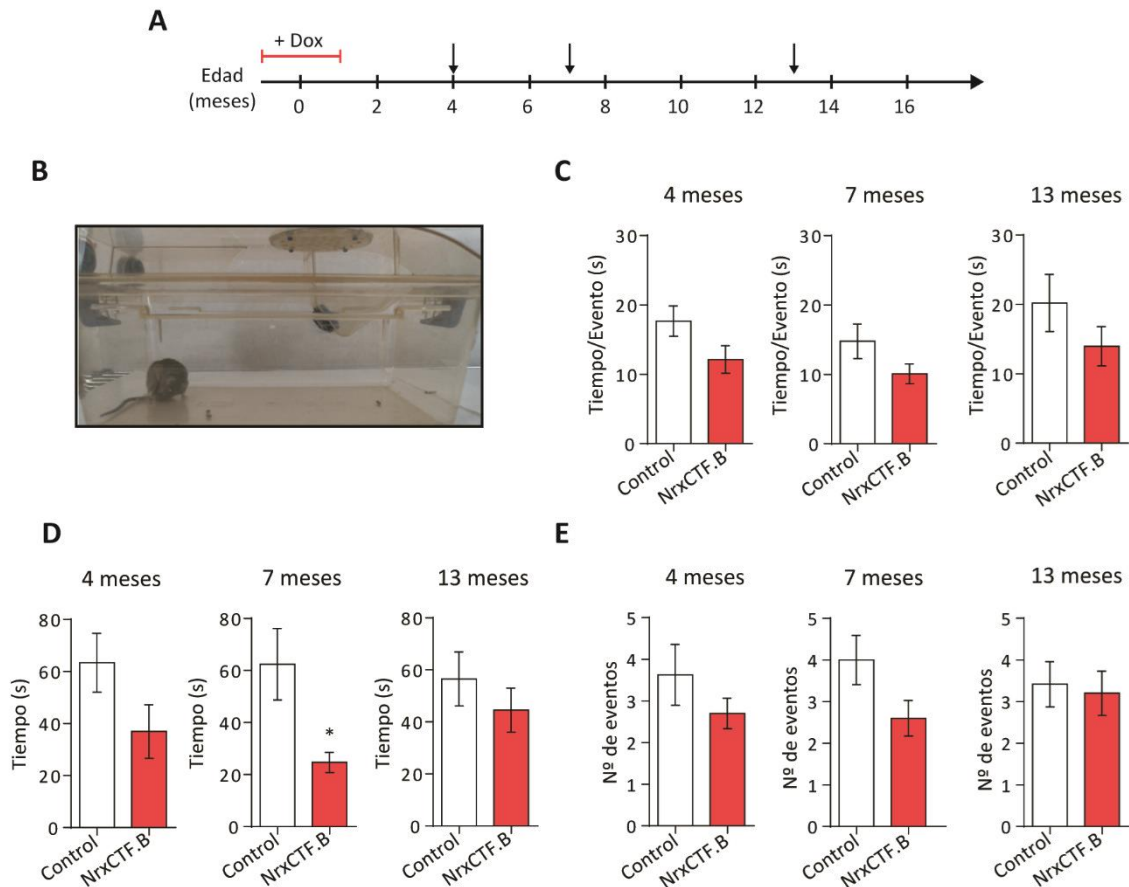




**Figura 58. Test de Rotarod.** **A**, Esquema del momento de la vida del animal en el que se realiza el test. **B**, Fotografía durante el test. **C**, Latencia de caída media para cada día y genotipo. **D**, Latencia de caída teniendo en cuenta la mejor medida de cada animal en ese día. N=10 ratones control, N=10 ratones NrxCtF.B. Análisis estadístico: Two-way ANOVA con *post-hoc* Bonferroni. *p*-value: \**p*<0.05, \*\**p*<0.01. Todas las barras de error son SEM. Test y extracción de datos: ACSH y CMC; Análisis de datos: ACSH.

### 3.2.5. Análisis de patrones repetitivos de comportamiento: test de acicalamiento

Este test se realizó a los 4, 7 y 13 meses de edad. Los resultados mostraron una tendencia general a la reducción en los tiempos totales y en los tiempos por evento en los ratones NrxCtF.B, si bien esta reducción no alcanzó significancia estadística, salvo en el tiempo total de acicalamiento a los 7 meses de edad (4 meses, Control:  $63.40 \pm 11.30$ ; NrxCtF.B:  $36.98 \pm 10.31$ ,  $p=0.1050$ . 7 meses, Control:  $62.44 \pm 13.74$ ; NrxCtF.B:  $24.88 \pm 3.85$ ,  $p=0.0244$ . 13 meses, Control:  $56.52 \pm 10.41$ ; NrxCtF.B:  $44.51 \pm 8.49$ ,  $p=0.3947$ . Unidades: s) (Figura 59). Esta tendencia a la reducción ya fue detectable en ratones NrxCtF.B de 4 meses de edad, el tiempo más joven ensayado. En comparación con los datos obtenidos con ratones NrxCtF.B de expresión temprana, el descenso en este comportamiento estereotipado no fue tan acusado en los ratones de expresión adulta.



**Figura 59. Test de acicalamiento.** **A**, Esquema de las edades en las que se realizó este test a la población de comportamiento de expresión adulta NrxCtf.B (4, 7 y 13 meses). **B**, Fotografía de un ratón realizando el test. **C**, Cuantificación del tiempo promedio de la duración de un evento de acicalamiento (en segundos). **D**, Cuantificación del tiempo total promedio de acicalamiento. **E**, Cuantificación del número promedio de eventos de acicalamiento. N=10-12 ratones control; N=10 ratones NrxCtf.B. Análisis estadístico: t-test. p-valor: \*p<0.05. Todas las barras de error son SEM. Test y extracción de datos: 4 y 7 meses: ACSH; 13 meses: CMC. Análisis de datos: ACSH.

### 3.2.6. Evaluación de la memoria

#### 3.2.6.1. Memoria de reconocimiento de un nuevo objeto

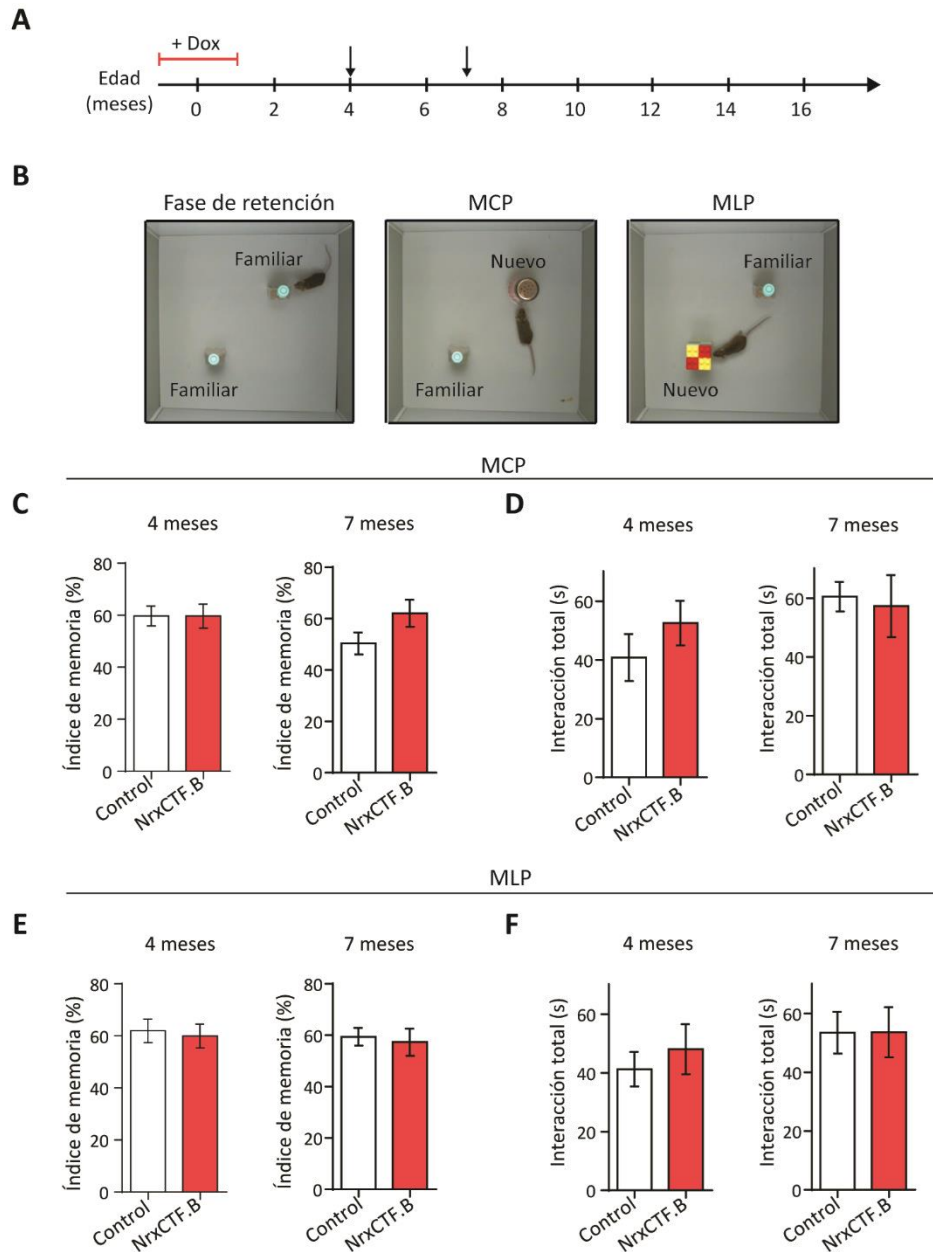
Esta prueba se evaluó en la población control y NrxCtf.B a los 4 y 7 meses. Los resultados mostraron un índice de memoria a corto y largo plazo similar en ambos grupos de ratones (4 meses, MCP, Control:  $59.71 \pm 3.83$ ; NrxCtf.B:  $59.69 \pm 4.61$ ,  $p=0.9970$ . MLP, Control:  $61.97 \pm 4.54$ ; NrxCtf.B:  $59.99 \pm 4.58$ ,  $p=0.7637$ . 7 meses, MCP, Control:  $50.34 \pm 4.31$ ; NrxCtf.B:  $62.07 \pm 5.27$ ,  $p=0.0970$ . MLP, Control:  $59.40 \pm 3.43$ ;

NrxCTF.B:  $57.29 \pm 5.31$ ,  $p=0.7338$ . Unidades: porcentaje de interacción con el objeto nuevo con respecto a la interacción total) (Figura 60C,E). Tampoco se observaron diferencias en el tiempo de interacción total (4 meses, MCP, Control:  $40.85 \pm 8.02$ ; NrxCTF.B:  $52.58 \pm 7.63$ ,  $p=0.3080$ . MLP, Control:  $41.25 \pm 5.84$ ; NrxCTF.B:  $48.09 \pm 8.50$ ,  $p=0.5038$ . 7 meses, MCP, Control:  $60.55 \pm 5.07$ ; NrxCTF.B:  $57.34 \pm 10.56$ ,  $p=0.7757$ . MLP, Control:  $53.51 \pm 7.11$ ; NrxCTF.B:  $53.63 \pm 8.51$ ,  $p=0.9914$ . Unidades: s) (Figura 60C,E). Por tanto, al igual que los ratones de expresión temprana, los ratones NrxCTF.B de expresión adulta no mostraron defectos de memoria en la prueba de reconocimiento de objetos.

### 3.2.7. Resumen de los ensayos de comportamiento de la línea NrxCTF.B con expresión adulta

A modo de resumen, se exponen de manera breve los datos más relevantes obtenidos en las pruebas realizadas en la población NrxCTF.B de expresión adulta (Figura 61). Estos datos indican que la expresión de NrxCTF exclusivamente en el cerebro adulto recapitula en buena parte los resultados obtenidos en ratones de expresión temprana.

En la prueba de campo abierto, los ratones NrxCTF.B presentan agitación motora en los dos modelos de expresión, si bien este efecto se retrasa al menos tres meses tras iniciar la expresión de HA-NrxCTF en el cerebro adulto. También observamos tendencias similares en el comportamiento de acicalamiento y en el test de laberinto elevado en cruz para ambos modelos de expresión. En ninguno de los dos modelos estos efectos estaban asociados con defectos en el test de reconocimiento de un nuevo objeto. Sin embargo debemos destacar que la comparación definitiva de ambos modelos de expresión requiere la realización de otros tests de memoria en los que los ratones NrxCTF.B de expresión temprana presentaron defectos, como el test de condicionamiento al miedo. Estos experimentos se encontraban en curso en el momento de escritura de esta Tesis Doctoral.



**Figura 60. Prueba de memoria de reconocimiento de objetos.** **A**, Esquema de las edades a las que se realizó el test en la población NrxCtf.B de expresión adulta (4 y 7 meses). **B**, Visión superior del test durante las tres fases: presentación del objeto familiar, memoria a corto plazo (3 horas), memoria a largo plazo (24 horas). **C**, Índice de memoria a corto plazo. **D**, Índice de exploración a corto plazo. Suma de la interacción total con los dos objetos. **E**, Índice de memoria a largo plazo. **F**, Índice de exploración a largo plazo. N=12 ratones control; N=10 ratones NrxCtf.B. Análisis estadístico utilizado: *t*-test. *p*-value: \**p*<0,05; \*\**p*-value<0.01. Todas las barras de error son SEM. Test, extracción y análisis de datos: ACSH.

## 4. Caracterización conductual del ratón NrxCtf.C

### 4.1. Cohorte de animales para comportamiento

Para hacer una primera exploración del fenotipo de esta línea, se utilizó una población común de 7 ratones control y 7 ratones dobles transgénicos NrxCtf.C de expresión adulta. El rango de edad de la población estaba comprendido en 3 semanas.

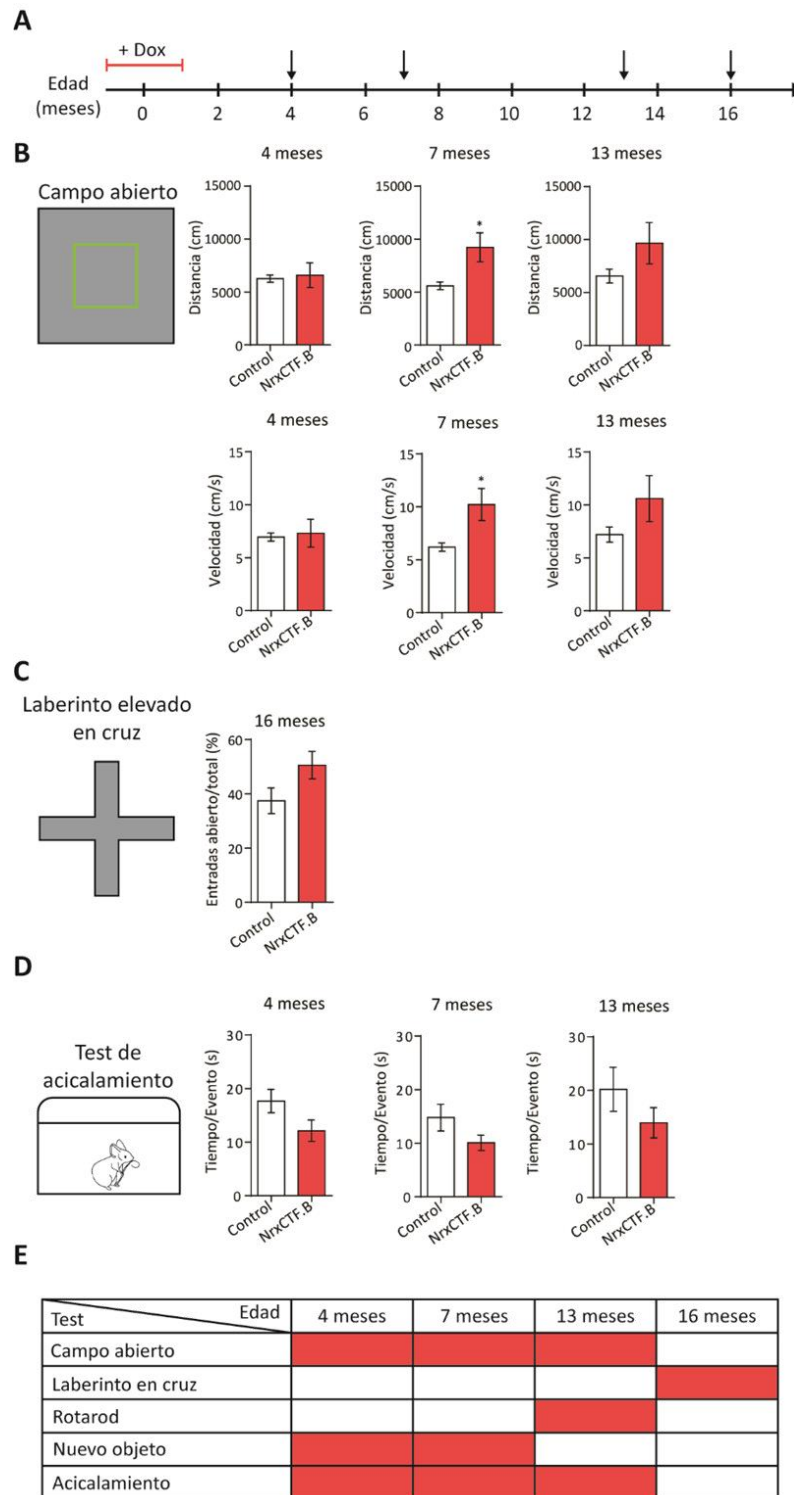
### 4.2. Evaluación general del estado del animal

Para evaluar el estado general del animal, al igual que se hizo en poblaciones anteriores, se realizó una batería de pruebas SHIRPA (Rogers et al., 1997) recogidas en el apartado 7.2. de Materiales y Métodos de esta Tesis. En dicho análisis no se detectaron problemas asociados a los ratones NrxCtf.C de expresión adulta.

### 4.3. Análisis de locomoción exploratoria: test de campo abierto

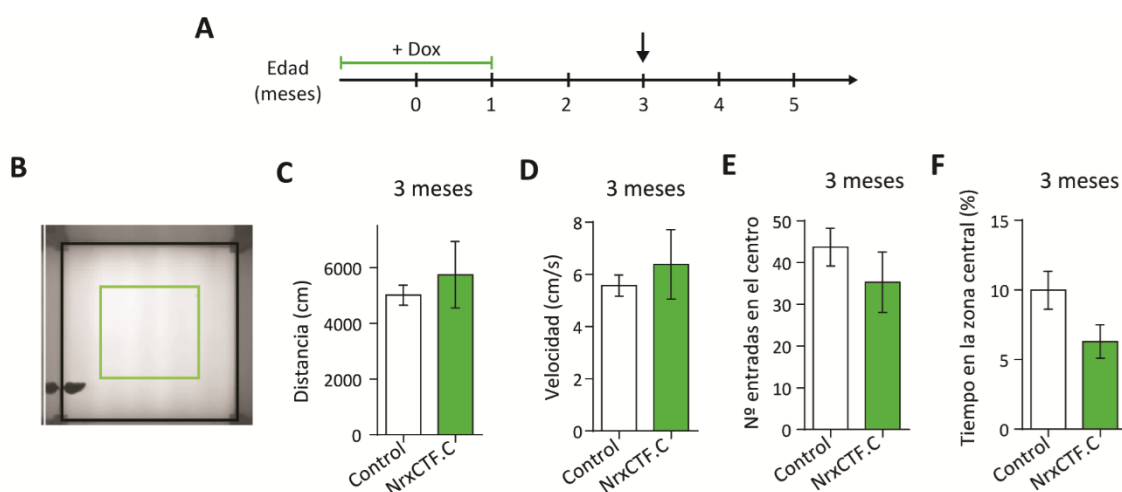
En una primera aproximación quisimos testar si en la línea NrxCtf.C de expresión adulta se observaban los mismos efectos que en la línea NrxCtf.B de expresión adulta. Por ello, realizamos el test de campo abierto a 3 meses de edad. Los datos obtenidos mostraron valores similares entre el grupo control y los ratones NrxCtf.C en distancia (Control:  $5016 \pm 362$ ; NrxCtf.C:  $5751 \pm 1196$ ,  $p=0.5675$ . Unidades: cm) y velocidad media (Control:  $5.57 \pm 0.41$ ; NrxCtf.C:  $6.39 \pm 1.33$ ,  $p=0.5683$ . Unidades: cm/s). También se observaron valores similares en el número de entradas a la zona central (Control:  $43.71 \pm 4.53$ ; NrxCtf.C:  $35.29 \pm 7.22$ ,  $p=0.3424$ ) y el tiempo de estancia en la zona central (Control:  $9.98 \pm 1.36$ ; NrxCtf.C:  $6.29 \pm 1.20$ ,  $p=0.0646$ . Unidades: porcentaje de tiempo en la zona central con respecto a la duración total del test) (Figura 62). Al comparar estos resultados con los resultados obtenidos en el test de campo abierto en la población NrxCtf.B de expresión adulta de edad parecida (4 meses), observamos que los valores en todos los parámetros analizados son prácticamente idénticos para las líneas NrxCtf.B y NrxCtf.C. Debido a que las regiones de expresión de HA-NrxCtf en las líneas NrxCtf.B

y NrxC.TF.C son diferentes, sería interesante continuar el fenotipaje de esta población y estudiar la evolución en el comportamiento tanto en este test como en una más amplia batería de pruebas conductuales.



**Figura 61. Tabla resumen de los test de mayor relevancia realizados en la población NrxC.TF.B de expresión adulta. A, Momentos de la vida de la población en la que se (Continúa pie de figura →)**

(←Continúa pie de figura) realizaron las pruebas (4, 7, 13 y 16 meses). **B**, Distancia y velocidad en el test de campo abierto a 4, 7 y 13 meses. **C**, Entradas en brazos abiertos del total de entradas (%) del laberinto elevado en cruz a 16 meses. **D**, Tiempo invertido por evento de acicalamiento en el test de acicalamiento a 4, 7 y 13 meses. **E**, Tabla resumen de los test que se realizaron a cada edad en esta población de ratones.



**Figura 62. Test de campo abierto en la población NrxCtf.C.** **A**, Esquema mostrando el momento de la vida del ratón de realización del test (3 meses). **B**, Vista superior de la arena. **C**, Distancia total recorrida. **D**, Velocidad media durante el test. **E**, Número de entradas a la zona central del test. **F**, Tiempo pasado por el ratón en la zona central expresado en porcentaje de tiempo total. N=7 controles, N=7 ratones NrxCtf.C. Análisis estadístico: *t*-test. Todas las barras de error son SEM. Test, extracción y análisis de datos: ACSH.

## 5. Posibles mecanismos afectados en el modelo transgénico de ratón NrxCtf.B

### 5.1. Análisis de neurodegeneración y pérdida neuronal

#### 5.1.1. Neurodegeneración

El cerebro adulto (3 meses) de ratones NrxCtf.B de expresión temprana presentó una reducción de peso de un 14% (Figura 63A). Debido a esto, se decidió ahondar en el estudio de la morfología del cerebro de la línea de ratones NrxCtf.B de expresión

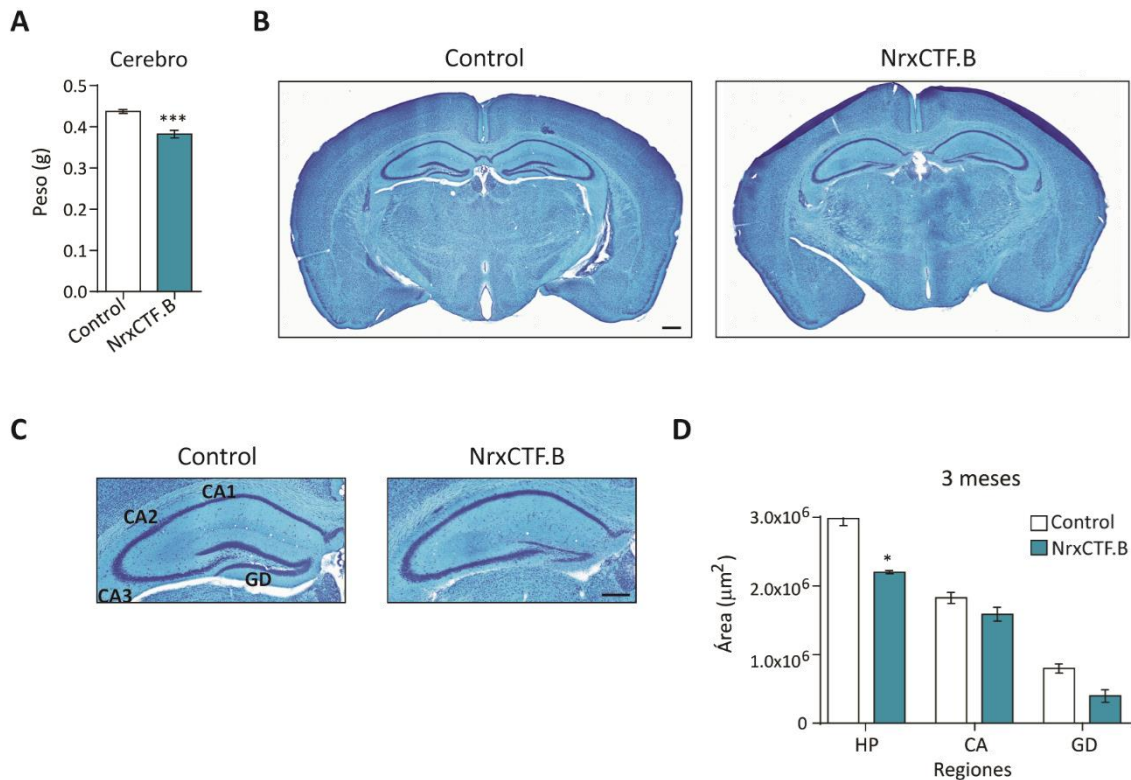
temprana y adulta. Para ello se usó la tinción de Nissl. Esta técnica permite adquirir medidas morfológicas de diversas regiones del cerebro donde tiene expresión el transgén HA-NrxCTF. Por la relevancia en memoria y en la AD, nos interesamos por el hipocampo y las subregiones que lo componen, *Cornu Ammonis* (CA: CA1, CA2, CA3) y GD.

En la población NrxCTF.B de expresión temprana observamos una reducción significativa en el área total del hipocampo a los 3 meses de edad (Control:  $2.98 \cdot 10^6 \pm 0.10 \cdot 10^6$ ; NrxCTF.B:  $2.20 \cdot 10^6 \pm 0.03 \cdot 10^6$ ,  $p=0.0175$ . Unidades:  $\mu\text{m}^2$ ). Esta reducción estaba asociada a una tendencia a la disminución en el área del GD de los ratones NrxCTF.B, mientras que el área de la región CA no presentó cambios (GD, Control:  $0.80 \cdot 10^6 \pm 0.07 \cdot 10^6$ ; NrxCTF.B:  $0.40 \cdot 10^6 \pm 0.09 \cdot 10^6$ ,  $p=0.0698$ . CA, Control:  $1.83 \cdot 10^6 \pm 0.08 \cdot 10^6$ ; NrxCTF.B:  $1.60 \cdot 10^6 \pm 0.10 \cdot 10^6$ ,  $p=0.2069$ . Unidades:  $\mu\text{m}^2$ ) (Figura 63D).

Al tratarse AD de una condición asociada al envejecimiento, nos resultó interesante estudiar la evolución temporal de los efectos visualizados en el hipocampo de ratones NrxCTF.B de 3 meses. Para ello, analizamos la morfología del hipocampo de ratones de la línea NrxCTF.B de expresión temprana y de expresión adulta a 16-18 meses de edad. El grupo control incluyó ratones *wild type* y simples transgénicos TRE-HA-NrxCTF y CaMKII-tTA. Los resultados obtenidos a partir de la cuantificación de las áreas del hipocampo total, de CA y de GD indicaron una reducción en cada una de las áreas analizadas en los ratones NrxCTF.B de 16-18 meses de expresión temprana con respecto a sus hermanos controles (Hipocampo, Control:  $6.50 \cdot 10^7 \pm 0.17 \cdot 10^7$ ; NrxCTF.B:  $4.82 \cdot 10^7 \pm 0.15 \cdot 10^7$ ,  $p<0.0001$ . CA, Control:  $3.98 \cdot 10^7 \pm 0.12 \cdot 10^7$ ; NrxCTF.B:  $3.46 \cdot 10^7 \pm 0.13 \cdot 10^7$ ,  $p<0.0083$ . GD, Control:  $1.43 \cdot 10^7 \pm 0.05 \cdot 10^7$ ; NrxCTF.B:  $0.47 \cdot 10^7 \pm 0.02 \cdot 10^7$ ,  $p<0.0001$ . Unidades:  $\mu\text{m}^2$ ) (Figura 64A).

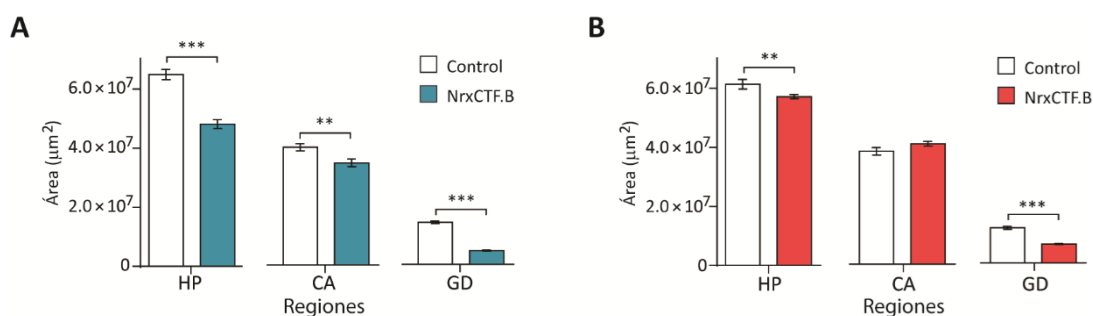
En los ratones de la línea NrxCTF.B de 16-18 meses de edad y expresión adulta, se observó una reducción estadísticamente significativa en el área total de hipocampo y de GD con respecto a los ratones control (Hipocampo, Control:  $6.14 \cdot 10^7 \pm 0.16 \cdot 10^7$ ; NrxCTF.B:  $5.72 \cdot 10^7 \pm 0.07 \cdot 10^7$ ,  $p<0.0100$ . GD, Control:  $1.19 \cdot 10^7 \pm 0.05 \cdot 10^7$ ; NrxCTF.B:  $0.64 \cdot 10^7 \pm 0.02 \cdot 10^7$ ,  $p<0.0001$ . Unidades:  $\mu\text{m}^2$ ) (Figura 64B).





**Figura 63. Análisis de la morfología del hipocampo de la línea NrxCtf.B de expresión temprana a 3 meses de edad mediante la tinción de Nissl. A,** Peso del cerebro de ratones control (N=11) y NrxCtf.B (N=9). **B,** Imágenes representativas de la tinción de Nissl de un ratón control y un ratón NrxCtf.B. **C,** Imágenes magnificadas del hipocampo de la tinción de Nissl mostrados en B. **D,** Cuantificación de las áreas hipocampo (HP), CA (capas CA1, CA2, CA3) y giro dentado (GD). N=2 ratones control, N=2 ratones NrxCtf.B. Cortes cuantificados: N=16 cortes control, N=14 cortes NrxCtf.B. Test estadístico: *t-test*. *p*-value: \**p*<0.05. Todas las barras de error son SEM. Escala: 500  $\mu\text{m}$ .

De forma interesante, la reducción observada en GD en ratones NrxCtf.B de inicio temprano fue de mayor magnitud que la presentada por los ratones NrxCtf.B de inicio de expresión adulta (67 vs 46 en porcentaje de reducción). Este dato podría indicar que la expresión de NrxCtf en la etapa más temprana de la vida del animal o la expresión por un espacio de tiempo más prolongado incrementa los efectos neurodegenerativos causados por su acúmulo en el cerebro envejecido.



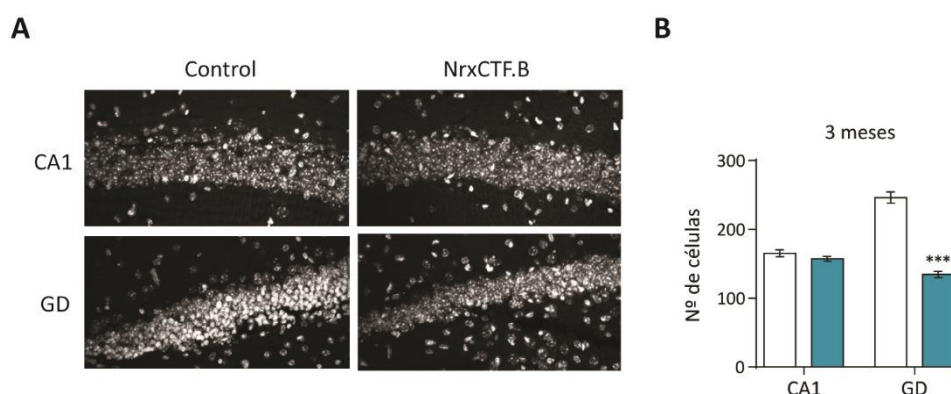
**Figura 64. Análisis morfológico del hipocampo de la línea NrxCtf.B de expresión temprana a 16-18 meses de edad mediante la tinción de Nissl. A,** Cuantificación para las áreas de hipocampo (HP), capas CA1-CA3 (CA) y giro dentado (GD). N=3 ratones control, N=2 ratones NrxCtf.B; hipocampos cuantificados: N=50 de ratones control, N=26 de ratones NrxCtf.B. **B,** Cuantificación para las áreas de hipocampo (HP), capas CA1-CA3 (CA) y giro dentado (GD). N=3 ratones control, N=4 ratones NrxCtf.B; hipocampos cuantificados: N=47 de ratones control, N=70 de ratones NrxCtf.B. Test estadístico: *t-test*. *p*-value: \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.0001$ . Todas las barras de error son SEM. Escala: 500  $\mu\text{m}$ .

### 5.1.2. Pérdida de neuronas

Como consecuencia de los resultados morfológicos observados mediante la tinción de Nissl, se decidió estudiar el número de neuronas en CA1 y en GD como medio para detectar un posible efecto en el número de células en estas áreas. Para ello se cuantificó el número de células positivas para DAPI (marcador del núcleo celular).

En ratones de 3 meses de la línea NrxCtf.B de expresión temprana se observó una reducción en el GD del número de células DAPI positivas de un 45% (Control:  $246.2 \pm 8.00$ ; NrxCtf.B:  $134.5 \pm 4.60$ ;  $p < 0.0001$ ) (Figura 65). En el momento de escritura de esta Tesis Doctoral no se pudo contar con los datos definitivos obtenidos de animales de 16-18 meses de expresión temprana y expresión adulta, pero observaciones preliminares indican una reducción en la densidad celular en las mismas áreas de dichos ratones (datos no mostrados).

Estos resultados junto con los anteriores obtenidos mediante la tinción de Nissl, sugieren que el acúmulo de NrxCtf tiene como consecuencia la pérdida de neuronas en el GD desde una edad temprana.



**Figura 65. Conteo del número de células DAPI positivas en una región acotada de las regiones CA1 y GD en ratones de la línea NrxCtf.B de expresión temprana.** **A**, Imágenes representativas de CA1 y GD de un ratón control y un ratón NrxCtf.B. **B**, Cuantificación del número de células DAPI positivas en CA1 y GD. N=3 ratones control, N=3 ratones NrxCtf.B. Cortes: CA1: N=8 control; N=15 NrxCtf.B; GD: N=13 control, N=15 NrxCtf.B. Test estadístico: *t-test*. *p*-value: \*\*\* $p < 0.0001$ . Todas las barras de error son SEM.

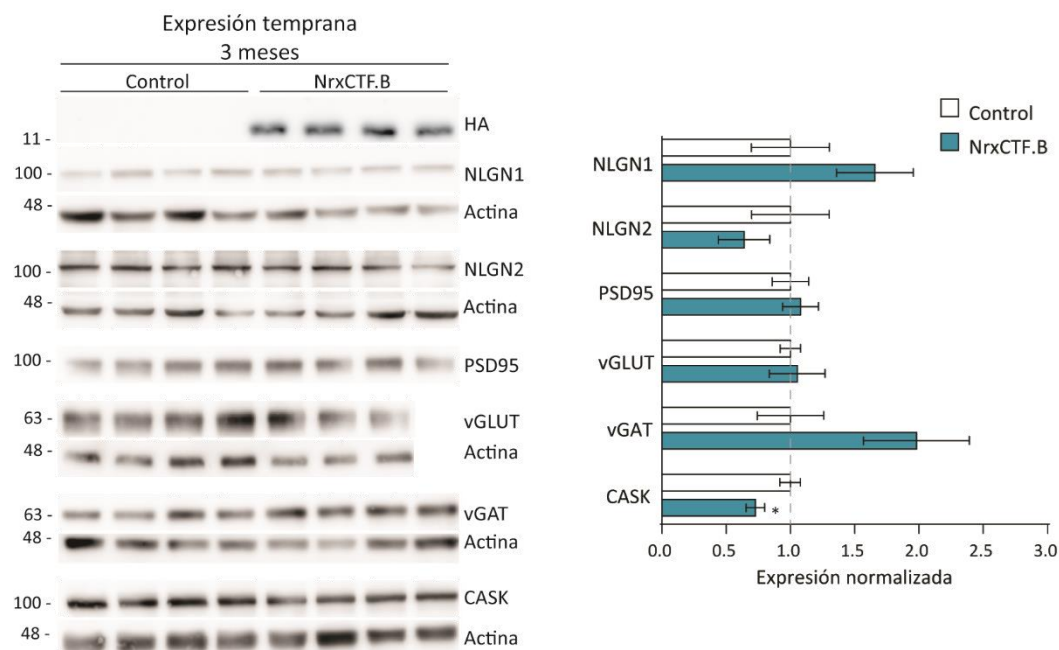
## 5.2. Análisis de los niveles de proteínas sinápticas candidatas

NrxCtf en el terminal presináptico podría interaccionar con determinados ligandos, produciendo un desplazamiento de su lugar natural de interacción que afectara a la estabilidad de las proteínas sinápticas afectadas. Para intentar estudiar esta posibilidad, seleccionamos una batería de proteínas sinápticas candidatas implicadas en la adhesión transináptica (NLGN1, NLGN2, NLGN3), proteínas de andamiaje del terminal postsináptico (PSD95) y del terminal presináptico (CASK), asociadas con vesículas sinápticas (vGLUT, vGAT), receptores de glutamato (NR1) y de la señalización de calcio (CaMKII). Las cuantificaciones se analizaron con anticuerpos específicos por *Western blot* en lisados totales de hipocampo, estriado y corteza de ratones control y ratones NrxCtf.B. Con el fin de evaluar la posible progresión temporal, analizamos la expresión de estas proteínas en animales jóvenes de expresión temprana y en animales envejecidos de expresión adulta.

### 5.2.1. Corteza

En el análisis de proteínas candidatas en la corteza de ratones NrxCtf.B, no observamos cambios significativos en ninguna de las proteínas evaluadas, salvo en CASK (Figura 66).

Los niveles de CASK se reducen alrededor de un 25% en la corteza de los ratones NrxCtf.B de 3 meses, el único punto evaluado en este caso (Control:  $1.00 \pm 0.08$ ; NrxCtf.B:  $0.728 \pm 0.07$ ;  $p=0.0414$ ). También se observó una tendencia al doble de expresión en vGAT de los ratones NrxCtf.B con respecto a los ratones control (Control:  $1.00 \pm 0.26$ ; NrxCtf.B:  $1.98 \pm 0.41$ ;  $p=0.0905$ ).



**Figura 66. Análisis de los niveles de expresión de proteínas sinápticas candidatas en la corteza de la línea de ratón NrxCtf.B de expresión temprana mediante *Western blot*.** **A,** Expresión de distintas proteínas en la línea NrxCtf.B de expresión temprana. **B,** Cuantificación de la expresión normalizada de diferentes marcadores sinápticos. PSD95 no está normalizado con un control de carga, sólo con respecto a los controles. Proteínas analizadas: NLGN1, NLGN2, PSD95, vGLUT, vGAT y CASK. N=3 control, N=3 NrxCtf.B. Anticuerpos utilizados: anti-NLGN1, anti-NLGN2, anti-PSD95, anti-vGLUT, anti-vGAT y anti-CASK. Como control de carga se empleó actina. Análisis estadístico: t-test.  $p$ -value: \* $p < 0.05$ . Todas las barras de error son SEM. Técnica realizada por: ACSH y Ana Santos. Cuantificación y análisis: ACSH.

### 5.2.2. Hipocampo

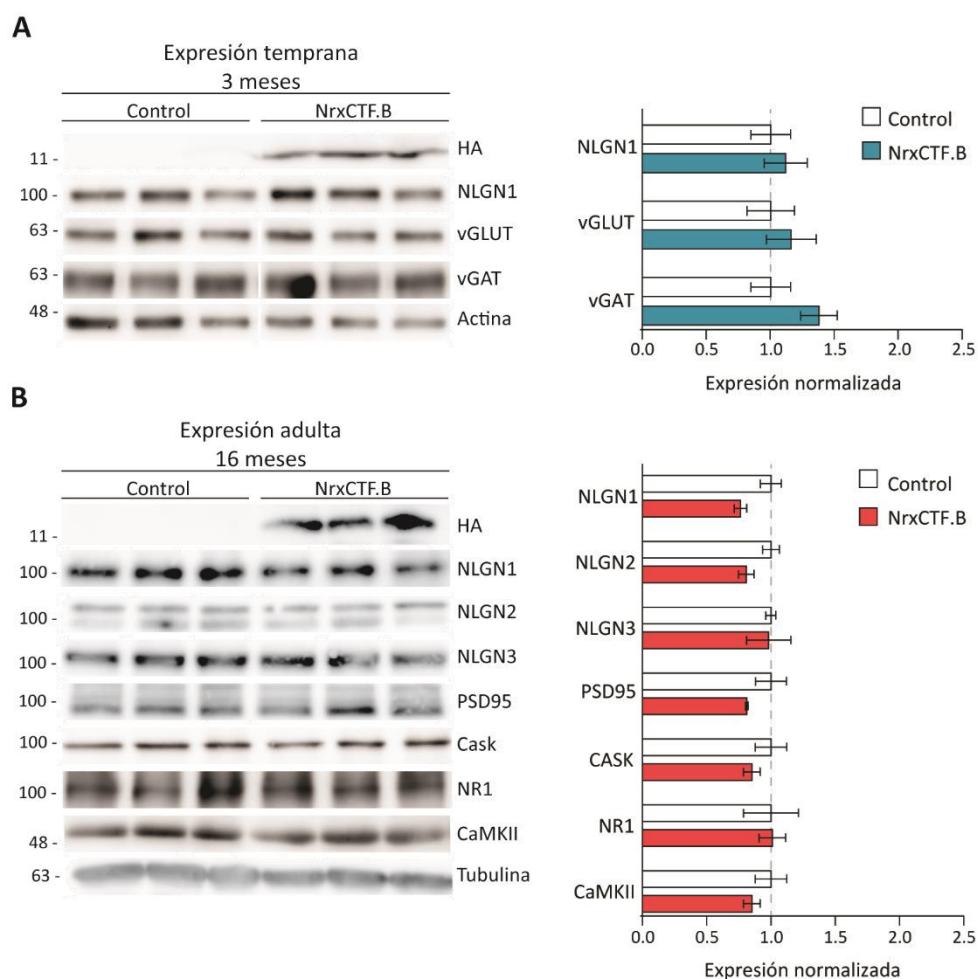
El análisis de proteínas candidatas en ratones de 3 meses de la línea NrxCtf.B de inicio de la expresión temprana no reveló cambios significativos en ninguna de las proteínas evaluadas (Figura 67A). Sin embargo, se observó una tendencia al aumento del 38% en la expresión de vGAT en ratones NrxCtf.B con respecto a los ratones control (Control:  $1.00 \pm 0.15$ ; NrxCtf.B:  $1.38 \pm 0.14$ ;  $p=0.1491$ ). De la misma forma, no se

observaron cambios estadísticamente significativos en el caso de animales NrxCtf.B de 16 meses de expresión adulta. Sin embargo, los niveles de NLGN1 mostraron una tendencia a la reducción de un 24% (Control:  $1.00 \pm 0.08$ ; NrxCtf.B:  $0.763 \pm 0.05$ ;  $p=0.0667$ ), acompañado de una tendencia a una reducción del 19% para NLGN2 en los mismos ratones (Control:  $1.00 \pm 0.07$ ; NrxCtf.B:  $0.81 \pm 0.06$ ;  $p=0.0976$ ) (Figura 67B).

### 5.2.3. Estriado

En el análisis de proteínas candidatas en ratones NrxCtf.B de 3 meses de expresión temprana, observamos una reducción significativa de NLGN1 de un 66% (Control:  $1.00 \pm 0.04$ ; NrxCtf.B:  $0.3391 \pm 0.04$ ,  $p=0.0002$ ) (Figura 68A). La reducción en los niveles estriatales de NLGN1 también se observó en ratones NrxCtf.B de 16 meses de expresión adulta, aunque con una menor magnitud (reducción del 24%) (Control:  $1.00 \pm 0.06$ ; NrxCtf.B:  $0.66 \pm 0.09$ ,  $p=0.0348$ ). El descenso en NLGN1 en el estriado de los ratones NrxCtf.B de 3 y 16 meses estuvo acompañado de una tendencia a un incremento en NLGN3 en ratones NrxCtf.B de 3 meses (Control:  $1.00 \pm 0.15$ ; NrxCtf.B:  $1.45 \pm 0.10$ ,  $p=0.0697$ ) y de 16 meses (Control:  $1.00 \pm 0.14$ ; NrxCtf.B:  $1.34 \pm 0.07$ ,  $p=0.0871$ ). También se observó una reducción pronunciada del 65% de NLGN2 al menos a los 16 meses y expresión adulta, el único punto analizado en estriado para esta proteína (Control:  $1.00 \pm 0.12$ ; NrxCtf.B:  $0.35 \pm 0.10$ ,  $p=0.0348$ ) (Figura 68B).

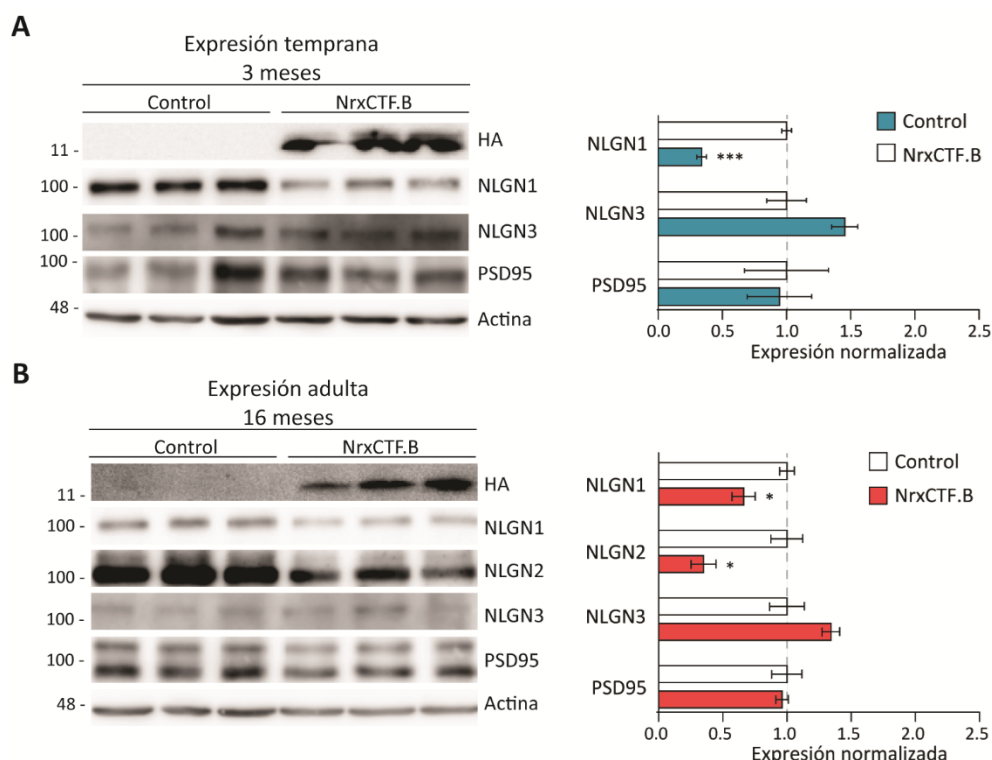
Para demostrar que el efecto causado en proteínas candidatas como NLGN1 era debido al acúmulo de HA-NrxCtf en ratones NrxCtf.B y no a efectos de los ratones simples transgénicos, se analizaron mediante *Western blot* los niveles de expresión de NLGN1 en ratones *wild type* (N=2), ratones NrxCtf.B (N=2) y en ratones simples transgénicos CaMKIIa-tTA (N=2) y TRE-HA-NrxCtf (N=1) (Figura 69). Los resultados obtenidos en nuevas muestras independientes confirmaron que la reducción en NLGN1 observada en el estriado de ratones NrxCtf.B de tres meses de edad se debe a la expresión de HA-NrxCtf, ya que no se observó en ratones simples transgénicos TRE-HA-NrxCtf o CaMKII-tTA.



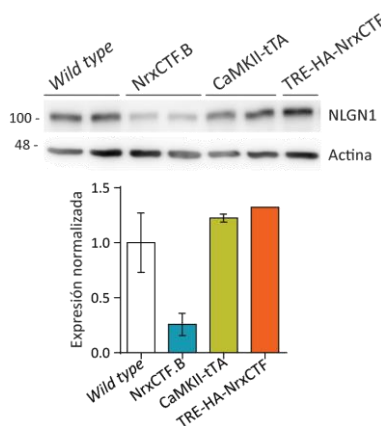
**Figura 67. Análisis de los niveles de expresión de proteínas sinápticas candidatas en hipocampo de la línea de ratón NrxCtf.B de expresión temprana y adulta mediante Western blot. A,** Expresión de distintas proteínas en la línea NrxCtf.B de expresión temprana a 3 meses de edad y su cuantificación. Proteínas analizadas: NLGN1, NLGN3, PSD95, vGLUT y vGAT. **B,** Expresión de distintas proteínas en la línea NrxCtf.B de expresión adulta a 16 meses de edad; y su cuantificación. Proteínas analizadas: NLGN1, NLGN2, NLGN3, PSD95, CASK, NR1 y CaMKII. N=3 control, N=3 NrxCtf.B. Anticuerpos utilizados: anti-NLGN1, anti-NLGN2, anti-NLGN3, anti-PSD95, anti-CASK, anti-NR1, anti-CaMKII. Se usó anti-HA como control de la expresión del transgén en los ratones NrxCtf.B. Control de carga: actina/tubulina. Test estadístico: *t-test*. Todas las barras de error son SEM.

Tras el análisis de diferentes proteínas candidatas en ratones de la línea NrxCtf.B de inicio de la expresión temprana a 3 meses de edad y de expresión adulta a 16 meses de edad, nuestros datos sugieren que el acúmulo de NrxCtf tiene efecto sobre los niveles de ligandos postsinápticos, especialmente NLGN1, pero también NLGN2. En próximos estudios sería interesante analizar la progresión temporal de los cambios en

proteínas sinápticas en distintas regiones cerebrales de ratones NrxCtf.B de expresión adulta.



**Figura 68. Análisis de los niveles de expresión de proteínas sinápticas candidatas en el estriado de la línea de ratón NrxCtf.B de expresión temprana y adulta mediante *Western blot*.** **A**, Expresión de distintas proteínas en la línea NrxCtf.B de expresión temprana y su cuantificación. Proteínas analizadas: NLGN1, NLGN3 y PSD95. **B**, Expresión de distintas proteínas en la línea NrxCtf.B de expresión adulta y su cuantificación. Proteínas analizadas: NLGN1, NLGN2, NLGN3 y PSD95. Anticuerpos utilizados: anti-NLGN1, anti-NLGN2, anti-NLGN3, anti-PSD95. Se usó anti-HA como control de la expresión del transgén en los ratones NrxCtf.B. N=3 control, N=3 NrxCtf.B. Control de carga actina. Análisis estadístico: *t*-test. *p*-value: \**p*<0.05, \*\*\**p*<0.001. Todas las barras de error son SEM.



**Figura 69. Análisis de la expresión de NLGN1 en estriado en los distintos (Continúa pie de figura →)**

(← Continúa pie de figura) genotipos de la línea doble transgénica NrxCtF.B mediante *Western blot*. Se usaron ratones de 3 meses de la línea NrxCtF.B de expresión temprana. Ratones *wild-type* (N=2), ratones NrxCtF.B (N=2), ratones simples transgénicos TRE-HA-NrxCtF (N=1) y ratones simples transgénicos CaMKIIa-tTA (N=2). Anticuerpo utilizado: anti-NLGN1 (4C12). Experimento realizado por: Francisco Arias Aragón.



## V. DISCUSIÓN

AD es una enfermedad neurodegenerativa asociada con el envejecimiento que se caracteriza por el deterioro progresivo de la memoria en los pacientes. Los síntomas más evidentes de AD debutan en etapas relativamente avanzadas de la vida tras un periodo aparentemente asintomático, dificultando su diagnóstico y tratamiento. Por ello, la identificación de mecanismos causantes de AD es clave para diseñar estrategias de diagnóstico temprano y para poder aliviar la progresión de la enfermedad tras su inicio. En esta Tesis Doctoral nos planteamos si el acúmulo del sustrato de PS asociado a AD, NrxCtf, puede desencadenar la cascada de eventos que conducen a la aparición de síntomas asociados con AD, como defectos sinápticos, conductuales y neurodegenerativos. Una pregunta aparentemente simple, cuya respuesta requiere acumular selectivamente NrxCtf en el cerebro adulto.

## 1. Generación de modelos de ratón transgénico para reproducir la falta de procesamiento de Neurexinas por Presenilinas

El factor causal mayoritario responsable de casos de AD son mutaciones de pérdida parcial de función en los genes de *PS1* y *PS2*, representando hasta un 90% de los casos de FAD. Las mutaciones en genes de *PS* asociados a FAD tienen una herencia autosómica dominante y las personas portadoras presentan un inicio precoz de la enfermedad. PS forman la subunidad catalítica del complejo  $\gamma$ -secretasa e interviene en el procesamiento proteolítico de multitud de sustratos. En los últimos años, nuestro grupo de investigación y otros ha demostrado que las Nrxs son sustratos proteolíticos de PS (Bot et al., 2011; Saura, Servián-Morilla et al., 2011; Servián-Morilla et al., 2018). La inhibición farmacológica o genética de la actividad de PS/ $\gamma$ -secretasa da lugar al acúmulo de NrxCtf *in vitro* e *in vivo*. Mutaciones en *PS1* asociadas con FAD, como *PS1*<sub>C410Y</sub>, *PS1*<sub>ΔE9</sub>, *PS1*<sub>L166P</sub>, *PS1*<sub>P436Q</sub>, impiden el procesamiento normal de NrxCtf, resultando en su acúmulo (Bot et al., 2011; Saura et al., 2011). NrxCtf se acumula en la fracción presináptica de ratones PS cDKO deficientes en genes *PS1/2* en neuronas glutamatérgicas, indicando que el procesamiento de NrxCtf ocurre en los terminales

presinápticos *in vivo* (Saura et al., 2011). El acúmulo presináptico de NrxCtf coincide con la presencia de defectos en la transmisión sináptica glutamatérgica y de establecimiento de LTP, pero precede a la neurodegeneración tardía de los ratones PS cDKO (Saura et al., 2004). Estos y otros resultados nos sugirieron que en el procesamiento impedido de Nrxs podrían mediar los déficits asociados a AD causados por una pérdida de función de PS. Según nuestra hipótesis, el acúmulo de NrxCtf en sinapsis glutamatérgicas podría afectar el funcionamiento normal del sistema Nrxs-Nlgn1 y desencadenar los defectos sinápticos, conductuales y neurodegenerativos asociados a FAD. En tal caso, el acúmulo selectivo de NrxCtf en el cerebro adulto debería reproducir total o parcialmente los defectos característicos de AD.

Con la finalidad de reproducir *in vivo* el efecto causado por la falta de procesamiento de Nrxs sin afectar la actividad de PS, decidimos expresar en el cerebro adulto una construcción que codifica HA-NrxCtf (Serván-Morilla et al., 2018). El éxito de nuestra estrategia dependía de alcanzar niveles de sobreexpresión que superasen la actividad endógena de PS hacia Nrxs, manteniendo el procesamiento hacia el resto de sustratos de PS. En esta Tesis Doctoral se han generado dos tipos de modelo de ratón transgénico de sobreexpresión del CTF de Nrxs, constitutivo e inducible. Los dos aproximaciones están basadas en la expresión específica de tejido regulada por el promotor CaMKII, que dirige la expresión a neuronas glutamatérgicas del prosencéfalo. En los ratones PS cDKO, la escisión génica de PS1 se produce alrededor del primer mes postnatal por una actividad Cre dirigida por el promotor CaMKII, evitando la muerte perinatal que ocurre en los ratones KO convencionales de PS1 (Shen et al., 1997). Por tanto, nuestra aproximación buscaba acumular específicamente NrxCtf en las mismas regiones cerebrales donde ocurre el acúmulo endógeno de NrxCtf en los ratones PS cDKO. El análisis de los niveles de expresión en los dos modelos mostró que los niveles de acúmulo de NrxCtf de las tres líneas obtenidas a partir del modelo constitutivo CaMKII-HA-NrxCtf fue bajo. De la misma forma, observamos niveles bajos o casi indetectables de expresión de HA-NrxCtf dirigido por el promotor CaMKII en experimentos de transfección en cultivo, insuficiente para superar la actividad de PS y que haya un acúmulo real del sustrato. Sin embargo, en las líneas inducibles dobles transgénicas NrxCtf.B y NrxCtf.C se observaron niveles detectables de expresión de

NrxCTF. En las líneas NrxCTF.B y NrxCTF.C la expresión exógena de HA-NrxCTF depende del sistema Tet-off regulado por el promotor CaMKII (Mayford et al., 1996). Estos datos indican un efecto amplificador del activador transcripcional tTA que incrementa los niveles de la proteína por encima de la actividad de PS, produciéndose el acúmulo de HA-NrxCTF en los ratones. Por tanto, los estudios realizados durante esta Tesis se centraron mayoritariamente en las líneas doble transgénicas NrxCTF.B y NrxCTF.C. Si bien en un futuro se podría explorar incrementar los niveles moderados de expresión de los ratones CaMKII-HA-NrxCTF de la línea C generando ratones con dos copias del transgén.

El patrón de expresión y la localización de la proteína HA-NrxCTF en el cerebro se analizó mediante experimentos de *Western blot* y de inmunohistoquímica en las líneas NrxCTF.B y NrxCTF.C. En la línea NrxCTF.B, HA-NrxCTF se expresa en el hipocampo, la corteza y el estriado, mientras que en la línea NrxCTF.C, HA-NrxCTF se restringe a una región limitada de la corteza y al estriado. La expresión de HA-NrxCTF en el hipocampo parece corresponder a proyecciones hacia esa zona, ya que no se detectaron células positivas en el hipocampo. Una vez obtenidas líneas que acumulan HA-NrxCTF en el cerebro, nos interesó analizar si el acúmulo ocurría en terminales presinápticos, como ocurre con NrxCTF endógena en ratones PS cDKO (Saura et al., 2011). Mediante experimentos de fraccionamiento celular, hemos demostrado que HA-NrxCTF se localiza en los terminales presinápticos de las diferentes regiones analizadas en la línea NrxCTF.B. De igual forma, se observó un patrón de expresión sináptico por inmunohistoquímica en el hipocampo de ratones NrxCTF.B, como son las proyecciones axonales hacia las neuronas piramidales de CA1 provenientes de neuronas piramidales de CA3 (vía colateral de Schaffer) y las terminaciones de las fibras musgosas en el *stratum lucidum* provenientes de las células granulares de GD. Los mecanismos de localización presináptica deben ser diferentes para el sustrato exógeno y endógeno. Mientras que la localización de NrxCTF endógena depende de la distribución de las proteínas encargadas de su procesamiento, la localización presináptica de HA-NrxCTF depende de su propia secuencia. Estos datos indican que el dominio citoplásmico común de Nrxs podría contener secuencias para su localización presináptica (Fairless et al., 2008). Por otra parte, datos previos de nuestro grupo han demostrado una localización

presináptica *in vivo* de un mutante de delección de  $\beta$ Nrx1 que carece del dominio citoplásmico (Rabaneda et al., 2014). En conjunto, estos resultados sugieren que la localización presináptica de Nrxs podría estar gobernada por secuencias en los dominios extracelular y citoplásmico.

NrxCTF endógena se detecta como un doble banda en experimentos de *Western blot* con anticuerpos contra el dominio citoplásmico (Saura et al., 2011). La identificación de los sitios de procesamiento del ectodominio en Nrx1 y Nrx3 han sugerido la existencia de dos sitios de corte, uno mayoritario más cercano al segmento transmembrana, y otro minoritario al 5' de éste (Borcel et al., 2016; Servián-Morilla et al., 2018). La secuencia de Nrx1 codificada por HA-NrxCTF comienza a partir del residuo producido por el sitio de corte mayoritario y carece de secuencias adicionales de Nrx1 al 5'. Sin embargo, HA-NrxCTF produce una doble banda detectada con anticuerpos anti-Cyto-Nrx y anti-HA, aunque la detección de la banda de menor movilidad con este anticuerpo es mas débil. Estos datos sugieren que en la generación de la doble banda de NrxCTF podrían también intervenir mecanismos postraduccionales (glicosilación, fosforilación) que afectaran la movilidad de un único sustrato.

La generación de las líneas dobles transgénicas NrxCTF nos ofrecía la posibilidad de regular la expresión temporal de la proteína exógena mediante el uso de Dox. En ratones NrxCTF.B, la expresión postnatal de HA-NrxCTF comienza en la segunda semana y se mantiene por el resto de la vida del animal. Hemos podido demostrar que el tratamiento con Dox en la fase embrionaria y postnatal temprana evita la expresión de HA-NrxCTF en ratones NrxCTF.B. De igual forma, el tratamiento con Dox en ratones NrxCTF.B adultos apaga la expresión del transgén a los pocos días. En la línea NrxCTF.C no se ha estudiado tan exhaustivamente el encendido y apagado con Dox, aunque la recuperación al nacimiento de la frecuencia genotípica en ratones tratados con Dox, hace sospechar el mismo efecto. La generación de líneas inducibles de expresión de HA-NrxCTF tiene repercusiones interesantes. Por una parte, se pueden evaluar los efectos ocasionados por el inicio del acúmulo de HA-NrxCTF a edades diferentes. Por otra parte, se puede examinar el posible efecto de detener el acúmulo de NrxCTF en la reversión de síntomas. Estas dos posibilidades se han comenzado a explorar en esta Tesis.

Para gran parte de nuestros estudios se emplearon dos aproximaciones de inicio de la expresión de la proteína HA-NrxCTF. Una aproximación que denominamos expresión temprana, que permite la expresión de HA-NrxCTF dependiente del promotor CaMKII desde etapas postnatales tempranas, sin descartar por completo la expresión en etapas embrionarias (véase a continuación). Otra aproximación de expresión adulta, que evita la expresión temprana y acumula HA-NrxCTF en el cerebro adulto, mediante el tratamiento con Dox desde la gestación hasta el primer mes de vida. Esta segunda aproximación reproduce más fielmente la pérdida de procesamiento de Nrxs selectivamente en la vida adulta e imita la pérdida de función de PS en ratones PS cDKO, en los que la escisión de PS1 ocurre a partir de P30 (Saura et al., 2011). Además, el inicio del acúmulo de NrxCTF en la vida adulta es una situación más cercana a AD.

Otro de los objetivos relevantes de nuestro diseño experimental consistía en acumular NrxCTF, sin afectar la actividad del complejo  $\gamma$ -secretasa ni el procesamiento de otros sustratos. Por experimentos de *Western blot* en ratones de la línea NrxCTF.B con expresión temprana de 3 meses de edad observamos que los niveles de expresión de proteínas componentes del complejo  $\gamma$ -secretasa como Nicastrina y la propia no estaban afectados. Por otro lado, tampoco se observó defectos en otros sustratos de la actividad PS/ $\gamma$ -secretasa como N-Cadherina. De forma similar a Nrxs, trabajos posteriores demuestran que Nlgn1 se procesa proteolíticamente por metaloproteasas y PS/ $\gamma$ -secretasa (Peixoto et al., 2012; Suzuki et al., 2012). El empleo de anticuerpos que reconocen el dominio citoplásmico de Nlgn1 no detectó un acúmulo de Nlgn1-CTF en los ratones NrxCTF.B (no mostrado). Por tanto, los resultados obtenidos con esta selección de candidatos apoyan que el complejo  $\gamma$ -secretasa y su actividad general no se afectan por el acúmulo selectivo de HA-NrxCTF.

Un último aspecto que decidimos abordar como parte de la caracterización, fue la comparación de los niveles de acúmulo de HA-NrxCTF generado por los ratones transgénicos con el acúmulo endógeno de NrxCTF. Para ello, elegimos la línea transgénica con mayor nivel de expresión, NrxCTF.B, y la comparamos con un modelo de AD ya establecido como APP<sub>sw</sub>/PS1 $\Delta$ E9 (Jankowsky et al., 2004). Observamos que los niveles de acúmulo en el hipocampo de HA-NrxCTF de ratones NrxCTF.B jóvenes triplica los niveles de acúmulo de ratones APP<sub>sw</sub>/PS1 $\Delta$ E9 envejecidos. Además, observamos que

los niveles endógenos NrxCtf incrementan con la edad en ratones control y en ratones APP<sub>sw</sub>/PS1<sub>ΔE9</sub>, alcanzando incrementos de 2-3 veces en ratones APP<sub>sw</sub>/PS1<sub>ΔE9</sub> comparados con ratones control en cada edad analizada. Estos datos indican que los ratones NrxCtf.B presentan niveles moderados de sobreexpresión. Además, muestran que NrxCtf se acumula durante el envejecimiento en el cerebro de ratones control y, en mayor magnitud, de ratones APP<sub>sw</sub>/PS1<sub>ΔE9</sub> modelo de AD. Una comparación definitiva con los niveles y las regiones de acúmulo de NrxCtf requerirá el análisis de modelos de pérdida de función que no sobreexpresen alelos de PS1, como por ejemplo ratones PS cDKO. Los ratones PS cDKO se encuentran ahora disponibles en el grupo gracias a la cesión de la Dra. Jie Shen (Harvard Medical School).

## 2. Posible efecto deletéreo en el modelo de ratón NrxCtf debido al acúmulo de HA-NrxCtf a edades tempranas

En la población NrxCtf.B de expresión temprana encontramos un ligero descenso en la frecuencia genotípica, asociado con mortalidad temprana y un decremento en el peso corporal comparado con la población de ratones control (ratones *wild type* y ratones simples transgénicos TRE-HA-NrxCtf y CaMKII-tTA). Estos efectos son más acuciados en machos. De forma similar, en estudios de frecuencia genotípica en la línea NrxCtf.C en una población relativamente pequeña de expresión temprana se observó que la frecuencia de aparición de ratones NrxCtf.C se reducía hasta el 0% y 8% en machos y hembras, respectivamente. El reducido número de ratones NrxCtf.C nacidos no nos permitió analizar otros parámetros, como peso y mortalidad perinatal. Estudios iniciales sugieren que la muerte embrionaria de los ratones NrxCtf.C de expresión temprana debe ocurrir entre E17 y E21. La menor frecuencia de ratones NrxCtf al nacimiento sugirió un efecto embrionario de HA-NrxCtf. En consonancia, observamos que la frecuencia de ratones NrxCtf.B y NrxCtf.C se recuperaba en ocasiones hasta valores por encima de los esperados (>25%) en poblaciones de expresión adulta. De forma similar, las diferencias en peso y la mortalidad temprana de la línea NrxCtf.B se recuperaba por completo en la población de expresión adulta. Cabe indicar que no

observamos una mayor mortalidad tras el encendido de HA-NrxCTF en el cerebro adulto. Estos datos indican una fase embrionaria o postnatal temprana de mayor susceptibilidad para el acúmulo de NrxCTF. En este sentido, NrxCTF se acumula en el cerebro de embriones KO de PS1, que presentan mortalidad perinatal y un menor tamaño (Shen et al., 1997; Saura et al., 2011). Ratones PS1 KI también presentan una reducción en peso desde el inicio de la vida (Xia et al., 2015). Este conjunto de resultados sugieren que el acúmulo de NrxCTF tiene un efecto deletéreo en la supervivencia tanto prenatal como postnatal temprana del ratón que puede contribuir al fenotipo de los ratones PS1 KO.

### 3. Evaluación fenotípica de los ratones NrxCTF.B y su asociación con AD

Una parte importante del diagnóstico de pacientes de AD depende de la evaluación de una serie de parámetros clínicos relacionados con el deterioro global y progresivo de la memoria y con una serie de pautas conductuales que presentan las personas que sufren la patología. Los pacientes de AD presentan alteraciones en la locomoción como agitación psicomotriz, trastornos en el estado de ánimo como ansiedad, estereotipias y, principalmente, se caracterizan por un deterioro progresivo de la memoria (American Psychiatric Association, 2013). Por estos motivos nos interesó evaluar el fenotipo de las líneas NrxCTF en tests de comportamiento a diferentes edades a lo largo de la vida.

Una de las características presentes en pacientes de AD es la alteración en la locomoción y en estereotipias (American Psychiatric Association, 2013). Los ratones NrxCTF.B presentan hiperactividad motora en el test de campo abierto, que se manifiesta por un incremento al doble de la distancia recorrida y la velocidad, en comparación con sus hermanos controles. Sin embargo, este efecto aparece a edades diferentes dependiendo del momento de inicio del acúmulo de HA-NrxCTF. En los ratones NrxCTF.B de expresión temprana, la hiperactividad motora es patente desde los 3 meses y se mantiene hasta el último punto testado, los 20 meses. En ratones NrxCTF.B de expresión adulta, la actividad motora en el test de campo abierto es normal a los 4 meses y se



duplica a partir de los 7 meses. Por el contrario, los ratones NrxCtf.B de expresión adulta de 4 meses de edad presentaron un descenso apreciable en el tiempo de acicalamiento que se mantuvo hasta los 13 meses. Un descenso similar en este comportamiento estereotipado se observó también en ratones NrxCtf.B de expresión temprana a los 12 y 20 meses, los únicos puntos analizados. La hiperactividad presente en los ratones NrxCtf.B se encuentra en modelos establecidos de AD como APP<sub>sw</sub>PS1<sub>M146L</sub> (Holcomb et al., 1999) y APP<sub>sw</sub>PS1<sub>ΔE9</sub> (Filali et al., 2011). La presencia de efectos similares en los tests de campo abierto y de acicalamiento en ratones adultos NrxCtf.B de expresión temprana y de expresión adulta, sugiere que la hiperactividad motora y el descenso en comportamientos estereotipados no dependen de un acúmulo preferencial de NrxCtf durante etapas concretas del desarrollo. De forma similar, los ratones NrxCtf.B de expresión temprana y adulta presentan una menor aversión por los espacios abiertos en el test del laberinto en cruz elevado. La aparición de hiperactividad motora en el test de campo abierto ocurre con una latencia de meses desde el acúmulo HA-NrxCtf, que se inicia a partir del segundo mes en el cerebro de ratones NrxCtf.B de expresión adulta. En este sentido, se ha publicado que los ratones PS cDKO presentan un comportamiento normal en el test de campo abierto a los dos meses, pero presentan defectos motores y de comportamientos estereotipados a partir del sexto mes (Saura et al., 2004). Por otra parte, el descenso en el tiempo de acicalamiento en ratones NrxCtf.B de expresión adulta precede a la aparición de hiperactividad motora. Estos datos sugieren que la caracterización en mayor profundidad del inicio temporal de defectos de comportamiento ocasionados por el acúmulo de NrxCtf en el cerebro podría resultar en la identificación de patrones conductuales con potencial interés clínico en fases tempranas de AD.

Una de las características más relevantes de AD es el deterioro de la memoria. Por ello realizamos diferentes tests de comportamiento que analizan memoria de trabajo a corto y largo plazo, memoria contextual, emocional y aprendizaje asociativo. De forma general, no observamos efectos de memoria en el test de reconocimiento de objeto nuevo en los ratones NrxCtf.B de expresión temprana o adulta. Además, los ratones NrxCtf.B de 3 meses de edad no mostraron diferencias con los controles en la prueba de evitación activa. Sin embargo, en la prueba de evitación pasiva, los ratones NrxCtf.B que cambiaron de compartimento mostraron tiempos de latencia menores que los

ratones control, indicando un posible descenso en memoria contextual a esa edad. La evaluación de la memoria en el test de condicionamiento al miedo en la misma población a los 20 meses de edad mostró un menor porcentaje de *freezing* en los ratones NrxCtf.B durante la fase de memoria contextual, sin alcanzar significancia estadística. En la fase del test dependiente de sonido, un tipo de memoria asociada con la amígdala, los ratones NrxCtf.B de 20 meses mostraron un descenso significativo respecto a los controles. Los ratones PS cDKO presentan defectos en la memoria contextual y espacial, que progresan con la edad. Por ejemplo, el porcentaje de *freezing* en la fase contextual del test de condicionamiento de miedo presenta una reducción mayor en ratones PS cDKO de 6 meses que de 2 meses (Saura et al., 2004). Por tanto, nuestros datos apoyan la hipótesis de que el acúmulo de NrxCtf podría participar en los defectos progresivos en memoria contextual causados por una pérdida de función de PS.

La asociación de los síntomas de AD con el envejecimiento plantea la pregunta de si los síntomas se pueden recuperar o aliviar tras su debut en edades avanzadas. El control temporal de la expresión de HA-NrxCtf en los ratones transgénicos de las líneas NrxCtf permite abordar esta pregunta. Por ello, en un experimento piloto tratamos con Dox ratones NrxCtf.B de 24 meses y los sometimos a ensayos de comportamiento. El tratamiento con Dox apagó la expresión de HA-NrxCtf eficientemente. Los resultados obtenidos en el test de campo abierto, test de acicalamiento y memoria de miedo condicionada no permitieron obtener resultados concluyentes, pero se observó una tendencia a la reversión en el test de memoria de miedo condicionada. El establecimiento de estas aproximaciones nos permitirá analizar en estudios futuros el efecto de detener el acúmulo de NrxCtf a diferentes edades tras la aparición de los primeros síntomas.

Los resultados obtenidos de la caracterización fenotípica de las líneas NrxCtf nos permitieron obtener las siguientes conclusiones. Los efectos causados por HA-NrxCtf se pueden dividir según la edad de inicio de su acúmulo en efectos dependientes de la expresión temprana y efectos independientes del inicio de la expresión. Así, la muerte temprana y el descenso en el peso y tamaño corporal dependen exclusivamente de la expresión probablemente prenatal y postnatal temprana de HA-NrxCtf. Por otra parte, la hiperactividad motora, el descenso en la estereotipia y en la aversión por los espacios abiertos, son independientes del momento de inicio de expresión de HA-NrxCtf,

aunque puede existir un tiempo de latencia distinto según el déficit concreto. La finalización de tests de memoria en ratones NrxCtf.B de expresión adulta nos permitirá concluir respecto al origen temporal del efecto en esta prueba. Basado en estos datos, se puede especular que la expresión en el cerebro embrionario de NrxCtf en ratones KO de PS1 (Saura et al., 2011) podría participar en la muerte perinatal de estos animales principalmente atribuida a una falta de señalización de Notch (Artavanis-Tsakonas et al., 1995; Shen et al., 1997). Por otra parte, el acúmulo progresivo que hemos detectado de NrxCtf durante el envejecimiento de ratones *wild type* y aumentado en los ratones APP<sub>sw</sub>/PS1<sub>ΔE9</sub> podría desencadenar defectos conductuales y cognitivos asociados con el envejecimiento normal y con AD.

#### 4. Posibles mecanismos afectados por el acúmulo de NrxCtf

Mediante la cuantificación del área del hipocampo, pudimos detectar una reducción entorno al 50% en GD en ratones NrxCtf de expresión temprana de 3 a 16-18 meses de edad. El área de GD en ratones NrxCtf de expresión adulta de 16-18 meses también estaba reducida, aunque la reducción fue de menor magnitud que la de ratones NrxCtf.B de la misma edad de expresión temprana. Este dato podría indicar que la expresión de NrxCtf en la etapa más temprana de la vida del animal o la expresión por un espacio de tiempo más prolongado incrementa los efectos neurodegenerativos causados por su acúmulo en el cerebro envejecido. En ratones PS cDKO y en ratones PS1<sub>L435F</sub> se ha mostrado neurodegeneración cortical dependiente de la edad, observándose en edades avanzadas (Saura et al., 2004; Wines-Samuelson et al., 2010; Xia et al., 2015). La reducción de GD en los ratones NrxCtf.B estaba asociada a una disminución del 50% en el número de neuronas, al menos en ratones de 3 meses de expresión temprana. Observaciones preliminares realizadas en el momento de escritura de esta Tesis Doctoral apuntan a una reducción en la densidad celular en el GD de ratones NrxCtf.B de 16-18 meses de expresión temprana y expresión adulta. El conjunto de estos resultados sugiere que el acúmulo de NrxCtf tiene como consecuencia la pérdida de neuronas en GD desde una edad temprana. Además de la

neurodegeneración, otra de las características clínicas más notables en AD es la aparición de la hiperfosforilación de la proteína Tau. En colaboración con el grupo del Dr. Javier Vitorica (Instituto de Biomedicina de Sevilla) hemos observado hiperfosforilación de Tau en lisados de hipocampo de ratones NrxCtf.B de expresión adulta de 16 meses, coincidente con la neurodegeneración en GD. De forma notable, la hiperfosforilación de Tau no aparece en ratones NrxCtf.B de 12 meses de edad (datos no mostrados). La pérdida de función de PS produce hiperfosforilación de Tau en los ratones PS cDKO (Saura et al., 2004). Estos datos sugieren que el acúmulo crónico de NrxCtf causado por una falta de función de PS podría ser responsable de la hiperfosforilación de Tau asociada a AD.

Una posible consecuencia de la hipótesis planteada de NrxC-Nlgn1 es que la función o los niveles de Nlgn1 en los terminales postsinápticos de neuronas glutamatérgicas se vean afectados por el acúmulo de NrxCtf. Por ello, se realizaron experimentos de análisis de diferentes proteínas sinápticas candidatas en ratones de la línea NrxCtf.B de inicio de la expresión temprana a 3 meses de edad y de expresión adulta a 16 meses de edad en hipocampo, corteza y estriado. El resultado más relevante de estos experimentos fue la reducción en los niveles del ligando de NrxC en sinapsis glutamatérgicas, Nlgn1. Los datos más prominentes se obtuvieron en el estriado de ratones NrxCtf.B tanto de expresión temprana como de expresión adulta, donde se observó una reducción del 50% en los niveles de Nlgn1 con respecto a los controles. Esta reducción está presente desde los 3 meses, indicando que el descenso en los niveles de Nlgn1 pudiera ser un marcador temprano de AD. Estos datos adquieren especial relevancia junto con los resultados recientemente publicados que muestran un descenso en los niveles de Nlgn1 y NrxC2 en el plasma de pacientes con AD (Goetzl et al., 2018).

La reducción en los niveles estriatales de Nlgn1 desde los 3 meses de edad en ratones NrxCtf.B de expresión temprana coincide con la aparición de la hiperactividad motora en campo abierto y la menor aversión por los brazos abiertos en el test de laberinto elevado en cruz, sugiriendo un efecto causal. Por ello sería interesante analizar en experimentos futuros si el descenso en Nlgn1 precede a la aparición de los defectos encontrados en comportamiento de ratones NrxCtf.B.

Estudios recientes han indicado un efecto en el comportamiento y la neurotoxicidad de ratones que expresan el transactivador de tetraciclina tTA regulado por CaMKII, dependiente de las estirpes de ratón (Han et al., 2012). En estos estudios, uno de los fondos genéticos estudiado fue B6FVBF1, similar los ratones B6FVBF2/J usados en nuestros experimentos con las líneas NrxCtf. Por ello decidimos segregar los distintos experimentos realizados en las líneas NrxCtf.B y NrxCtf.C en los 4 genotipos posibles (*wild type*, simples transgénicos TRE-HA-NrxCtf, simples transgénicos CaMKII-tTA y dobles transgénicos NrxCtf.B). Observamos que la frecuencia genotípica al nacer, mortalidad, peso corporal y del cerebro no están afectados en los ratones simples transgénicos TRE-HA-NrxCtf y CaMKII-tTA. En la evaluación de pruebas conductuales, los ratones simples transgénicos TRE-HA-NrxCtf y CaMKII-tTA de entre 3 y 12 meses mostraron un comportamiento similar a los ratones *wild type* (Anexo 1). En la prueba de condicionamiento al miedo, observamos que los ratones simples transgénicos CaMKII-tTA presentaron un descenso en *freezing* en memoria contextual similar a los ratones NrxCtf.B, no ocurriendo así para memoria dependiente de sonido. Estas observaciones van en contra de resultados previos obtenidos con poblaciones más amplias de ratones CaMKII-tTA, donde no se observaron cambios en memoria contextual en la misma prueba (Han et al., 2012). Por otro lado, el análisis del área del GD en ratones simples transgénicos CaMKII-tTA y TRE-HA-NrxCtf de edad avanzada (16-18 meses) no nos permitió alcanzar resultados concluyentes, debido al número reducido de ratones (N=1). Se ha demostrado que los efectos producidos por CaMKII-tTA en el área de GD se evitan con el tratamiento con Dox de P1 a P40 (Han et al., 2012). Por último, los ratones simples transgénicos TRE-HA-NrxCtf y CaMKII-tTA mostraron niveles estriatales de Nlgn1 similares a los ratones *wild type*, demostrando un efecto específico de la expresión de HA-NrxCtf en la reducción de Nlgn1.

La reducción en los niveles de Nlgn1 ocasionado por el acúmulo de NrxCtf es intrigante, pero apoya nuestra hipótesis de un desmantelamiento del sistema de NrxCtf-Nlgn1 en AD. Debido a la función del complejo mediado por NrxCtf-Nlgn1 (Song et al., 1999; Scheiffele et al., 2000; Dean et al., 2003; Chih et al., 2005) el descenso en los niveles de Nlgn1 podría afectar al funcionamiento o mantenimiento de las sinapsis glutamatérgicas. En la misma línea, se ha mostrado que el descenso en el número de

sinapsis correlaciona con la pérdida cognitiva de los pacientes de AD (DeKosky y Scheff, 1990; Terry et al., 1991). Además, nuestros datos podrían tener implicaciones más allá de FAD. Se ha demostrado que inyección del péptido A $\beta$  en el hipocampo de ratones produce una reducción de aproximadamente 50% en los niveles de Nlgn1 por un mecanismo epigenético de silenciamiento del promotor (Bie et al., 2014). Este descenso en los niveles de Nlgn1 resulta en una inducción impedida de LTP en las neuronas CA1 de hipocampo y defectos en memoria espacial en el laberinto acuático de Morris (Bie et al., 2014). Cabe recordar que la mutación Nlgn1 Thr271fs identificada por nuestro grupo en un caso familiar de AD produce un descenso similar de un 50% en los niveles de Nlgn1 (Tristán-Clavijo et al., 2015). La función del complejo Nrx-Nlgn1 se podría afectar por interacción directa del péptido A $\beta$  con sus componentes (Naito et al., 2017). Por tanto, los datos recogidos en esta Tesis Doctoral apoyan una ruta emergente en AD, en la que alteraciones del complejo mediado por Nrxs-Nlgn1 por diversas causas, como mutaciones en PS asociadas a FAD, mutaciones en los miembros del complejo, o mecanismos mediados por A $\beta$  desestabilizan el complejo Nrx-Nlgn1 y conduce a síntomas asociados a AD.

## VI. CONCLUSIONES

Los resultados mostrados en esta Tesis Doctoral permiten extraer las siguientes conclusiones:

1. Se generaron ratones transgénicos de expresión constitutiva e inducible del sustrato de Presenilinas, HA-NrxCTF, basados en la actividad específica del promotor neuronal CaMKII.
2. En general, los niveles de expresión de HA-NrxCTF son bajos en el cerebro de los ratones transgénicos constitutivos CaMKII-HA-NrxCTF. Las líneas transgénicas inducibles NrxCTF.B y NrxCTF.C acumulan HA-NrxCTF en el cerebro con un patrón diferencial.
3. La expresión postnatal de HA-NrxCTF comienza en la segunda semana de vida en los ratones de la línea NrxCTF.B y se mantiene en la vida adulta. La localización de la proteína HA-NrxCTF ocurre mayoritariamente en fracciones presinápticas de sinaptosomas.
4. En las líneas transgénicas inducibles el tratamiento con Doxiciclina permite regular el momento de inicio y de apagado de HA-NrxCTF.
5. La expresión de proteínas asociadas con el complejo  $\gamma$ -secretasa, como Presenilinas o Nicastrina, no se alteran por el acúmulo de HA-NrxCTF en el cerebro. El procesamiento mediado por el complejo  $\gamma$ -secretasa de los sustratos sinápticos analizados no se afecta.
6. Los niveles endógenos de NrxCTF en el hipocampo incrementan durante el envejecimiento normal en ratones silvestres. El incremento de NrxCTF asociado con la edad es mayor en ratones APP<sub>sw</sub>/PS1 $\Delta$ E9.
7. El acúmulo temprano de HA-NrxCTF resulta en una menor frecuencia genotípica al nacimiento en las líneas NrxCTF, asociada con una alta tasa de mortalidad temprana y un decremento en el peso corporal en ratones NrxCTF.B, efectos más patentes en machos. La inhibición de la expresión de HA-NrxCTF durante la etapa embrionaria y postnatal temprana recupera valores normales de frecuencia al



nacimiento y suprime la mortalidad temprana y el descenso en peso en las líneas NrxCtf.

8. El acúmulo temprano o adulto de HA-NrxCtf en el ratón NrxCtf.B provoca la aparición de defectos conductuales. Los ratones NrxCtf.B presentan una alta actividad motora, menor aversión a los espacios abiertos, menor tiempo de acicalamiento y defectos en la memoria de condicionamiento al miedo.
9. La inhibición de la expresión de la proteína HA-NrxCtf en la etapa temprana del desarrollo retrasa la aparición de la alta actividad motora. El acúmulo de HA-NrxCtf se puede inhibir con Doxiciclina en ratones NrxCtf.B envejecidos tras la aparición de los síntomas.
10. La expresión de HA-NrxCtf podría provocar neurodegeneración y pérdida de neuronas en el giro dentado del hipocampo.
11. La expresión del ligando postsináptico de Neurexinas, Neuroligina-1, se reduce en regiones del cerebro de ratones NrxCtf.B desde edades tempranas.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- American Psychiatric Association. (2013). *Guía de consulta de los criterios diagnósticos del DSM-5®*. American Psychiatric Publishing.
- Aoto, J., Földy, C., Ilcus, S. M. C., Tabuchi, K., Südhof, T. C. (2015). Distinct circuit-dependent functions of presynaptic neurexin-3 at GABAergic and glutamatergic synapses. *Nature Neuroscience*, 18(7), 997-1007.
- Araki, Y., Miyagi, N., Kato, N., Yoshida, T., Wada, S., Nishimura, M., Suzuki, T. (2004). Coordinated metabolism of Alcadein and amyloid beta-protein precursor regulates FE65-dependent gene transactivation. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(23), 24343-24354.
- Armstrong, R. A. (2006). Plaques and tangles and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Folia Neuropathologica*, 44(1), 1-11.
- Artavanis-Tsakonas, S., Matsuno, K., Fortini, M. E. (1995). Notch signaling. *Science (New York, N.Y.)*, 268(5208), 225-232.
- Baudouin, S., Scheiffele, P. (2010). SnapShot: Neuroligin-Neurexin Complexes. *Cell*, 141(5), 908-908.e1.
- Bayer, T. A., Wirths, O., Majtényi, K., Hartmann, T., Multhaup, G., Beyreuther, K., Czech, C. (2001). Key factors in Alzheimer's disease: beta-amyloid precursor protein processing, metabolism and intraneuronal transport. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 11(1), 1-11.
- Beel, A. J., Sanders, C. R. (2008). Substrate specificity of gamma-secretase and other intramembrane proteases. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 65(9), 1311-1334.
- Beglopoulos, V., Sun, X., Saura, C. A., Lemere, C. A., Kim, R. D., Shen, J. (2004). Reduced beta-amyloid production and increased inflammatory responses in presenilin conditional knock-out mice. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(45), 46907-46914.
- Bezprozvanny, I., Mattson, M. P. (2008). Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends in Neurosciences*, 31(9), 454-463.
- Bie, B., Wu, J., Yang, H., Xu, J. J., Brown, D. L., Naguib, M. (2014). Epigenetic suppression of neuroligin 1 underlies amyloid-induced memory deficiency. *Nature Neuroscience*, 17(2), 223-231.
- Biederer, T., Südhof, T. C. (2001). CASK and protein 4.1 support F-actin nucleation on neurexins. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(51), 47869-47876.
- Bonn, S., Seeburg, P. H., Schwarz, M. K. (2007). Combinatorial expression of alpha- and gamma-protocadherins alters their presenilin-dependent processing. *Molecular and Cellular Biology*, 27(11), 4121-4132.
- Borcel, E., Palczynska, M., Krzisch, M., Dimitrov, M., Ulrich, G., Toni, N., Fraering, P. C. (2016). Shedding of neurexin 3β ectodomain by ADAM10 releases a soluble fragment that affects the development of newborn neurons. *Scientific Reports*, 6.

- Bossy-Wetzel, E., Schwarzenbacher, R., Lipton, S. A. (2004). Molecular pathways to neurodegeneration. *Nature Medicine*, 10 Suppl, S2-9.
- Bot, N., Schweizer, C., Ben Halima, S., Fraering, P. C. (2011). Processing of the synaptic cell adhesion molecule neurexin-3beta by Alzheimer disease alpha- and gamma-secretases. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(4), 2762-2773.
- Boucard, A. A., Chubykin, A. A., Comoletti, D., Taylor, P., Südhof, T. C. (2005). A splice code for trans-synaptic cell adhesion mediated by binding of neuroligin 1 to alpha- and beta-neurexins. *Neuron*, 48(2), 229-236.
- Budreck, E. C., Scheiffele, P. (2007). Neuroligin-3 is a neuronal adhesion protein at GABAergic and glutamatergic synapses. *The European Journal of Neuroscience*, 26(7), 1738-1748.
- Butz, S., Okamoto, M., Südhof, T. C. (1998). A tripartite protein complex with the potential to couple synaptic vesicle exocytosis to cell adhesion in brain. *Cell*, 94(6), 773-782.
- Camacho-Garcia, R. J., Hervás, A., Toma, C., Balmaña, N., Cormand, B., Martinez-Mir, A., Scholl, F. G. (2013). Rare variants analysis of neurexin-1 $\beta$  in autism reveals a novel start codon mutation affecting protein levels at synapses. *Psychiatric Genetics*, 23(6), 262-266.
- Camacho-Garcia, R. J., Planelles, M. I., Margalef, M., Pecero, M. L., Martínez-Leal, R., Aguilera, F., Scholl, F. G. (2012). Mutations affecting synaptic levels of neurexin-1 $\beta$  in autism and mental retardation. *Neurobiology of Disease*, 47(1), 135-143.
- Checler, F. (1995). Processing of the beta-amyloid precursor protein and its regulation in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 65(4), 1431-1444.
- Cheung, K.-H., Shineman, D., Müller, M., Cárdenas, C., Mei, L., Yang, J., Foscett, J. K. (2008). Mechanism of Ca<sup>2+</sup> disruption in Alzheimer's disease by presenilin regulation of InsP3 receptor channel gating. *Neuron*, 58(6), 871-883.
- Chih, B., Engelman, H., Scheiffele, P. (2005). Control of excitatory and inhibitory synapse formation by neuroligins. *Science (New York, N.Y.)*, 307(5713), 1324-1328.
- Chih, B., Gollan, L., Scheiffele, P. (2006). Alternative splicing controls selective trans-synaptic interactions of the neuroligin-neurexin complex. *Neuron*, 51(2), 171-178.
- Chubykin, A. A., Atasoy, D., Etherton, M. R., Brose, N., Kavalali, E. T., Gibson, J. R., Südhof, T. C. (2007). Activity-dependent validation of excitatory versus inhibitory synapses by neuroligin-1 versus neuroligin-2. *Neuron*, 54(6), 919-931.
- De Strooper, B. (2010). Proteases and proteolysis in Alzheimer disease: a multifactorial view on the disease process. *Physiological Reviews*, 90(2), 465-494.
- Dean, C., Dresbach, T. (2006). Neuroligins and neurexins: linking cell adhesion, synapse formation and cognitive function. *Trends in Neurosciences*, 29(1), 21-29.

- Dean, C., Scholl, F. G., Choih, J., DeMaria, S., Berger, J., Isacoff, E., Scheiffele, P. (2003). Neurexin mediates the assembly of presynaptic terminals. *Nature Neuroscience*, 6(7), 708-716.
- DeKosky, S. T., Scheff, S. W. (1990). Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Annals of Neurology*, 27(5), 457-464.
- Delacourte, A. (2005). Tauopathies: recent insights into old diseases. *Folia Neuropathologica*, 43(4), 244-257.
- Doody, R. S., Raman, R., Farlow, M., Iwatsubo, T., Vellas, B., Joffe, S., Mohs, R. (2013, julio 24). A Phase 3 Trial of Semagacestat for Treatment of Alzheimer's Disease [research-article].
- Drachman, D. A. (2006). Aging of the brain, entropy, and Alzheimer disease. *Neurology*, 67(8), 1340-1352.
- Duggan, S. P., McCarthy, J. V. (2016). Beyond  $\gamma$ -secretase activity: The multifunctional nature of presenilins in cell signalling pathways. *Cellular Signalling*, 28(1), 1-11.
- Fairless, R., Masius, H., Rohlmann, A., Heupel, K., Ahmad, M., Reissner, C., Missler, M. (2008). Polarized targeting of neurexins to synapses is regulated by their C-terminal sequences. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(48), 12969-12981.
- Filali, M., Lalonde, R., Rivest, S. (2011). Anomalies in social behaviors and exploratory activities in an APPswe/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Physiology & Behavior*, 104(5), 880-885.
- Fiúza, U.-M., Arias, A. M. (2007). Cell and molecular biology of Notch. *The Journal of Endocrinology*, 194(3), 459-474.
- Games, D., Adams, D., Alessandrini, R., Barbour, R., Berthelette, P., Blackwell, C., Gillespie, F. (1995). Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature*, 373(6514), 523-527.
- Gascón, S., Paez-Gomez, J. A., Díaz-Guerra, M., Scheiffele, P., Scholl, F. G. (2008). Dual-promoter lentiviral vectors for constitutive and regulated gene expression in neurons. *Journal of Neuroscience Methods*, 168(1), 104-112.
- Gertsik, N., Chiu, D., Li, Y. (2015). Complex Regulation of gamma-Secretase: from Obligatory to Modulatory Subunits. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6.
- Giagtzoglou, N., Ly, C. V., Bellen, H. J. (2009). Cell adhesion, the backbone of the synapse: «vertebrate» and «invertebrate» perspectives. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(4), a003079.
- Goedert, M., Spillantini, M. G. (2006). A century of Alzheimer's disease. *Science (New York, N.Y.)*, 314(5800), 777-781.

- Goetzl, E. J., Abner, E. L., Jicha, G. A., Kapogiannis, D., Schwartz, J. B. (2018). Declining levels of functionally specialized synaptic proteins in plasma neuronal exosomes with progression of Alzheimer's disease. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 32(2), 888-893.
- Graf, E. R., Zhang, X., Jin, S.-X., Linhoff, M. W., Craig, A. M. (2004). Neurexins Induce Differentiation of GABA and Glutamate Postsynaptic Specializations via Neuroligins. *Cell*, 119(7), 1013-1026.
- Green, K. N., Demuro, A., Akbari, Y., Hitt, B. D., Smith, I. F., Parker, I., LaFerla, F. M. (2008). SERCA pump activity is physiologically regulated by presenilin and regulates amyloid beta production. *The Journal of General Physiology*, 132(2), i1.
- Grootjans, J. J., Reekmans, G., Ceulemans, H., David, G. (2000). Syntenin-syndecan binding requires syndecan-syntenin and the co-operation of both PDZ domains of syntenin. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(26), 19933-19941.
- Haapasalo, A., Kovacs, D. M. (2011). The many substrates of presenilin/ $\gamma$ -secretase. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 25(1), 3-28.
- Haas, I. G., Frank, M., Véron, N., Kemler, R. (2005). Presenilin-dependent processing and nuclear function of gamma-protocadherins. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(10), 9313-9319.
- Halbleib, J. M., Nelson, W. J. (2006). Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes & Development*, 20(23), 3199-3214.
- Hambusch, B., Grinevich, V., Seeburg, P. H., Schwarz, M. K. (2005).  $\gamma$ -Protocadherins, presenilin-mediated release of C-terminal fragment promotes locus expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(16), 15888-15897.
- Han, H. J., Allen, C. C., Buchovecky, C. M., Yetman, M. J., Born, H. A., Marin, M. A., Jankowsky, J. L. (2012). Strain background influences neurotoxicity and behavioral abnormalities in mice expressing the tetracycline transactivator. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(31), 10574-10586.
- Hardy, J., Allsop, D. (1991). Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, 12(10), 383-388.
- Hardy, John, Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5580), 353-356.
- Hayrapetyan, V., Rybalchenko, V., Rybalchenko, N., Koulen, P. (2008). The N-terminus of presenilin-2 increases single channel activity of brain ryanodine receptors through direct protein-protein interaction. *Cell Calcium*, 44(5), 507-518.
- Herrup, K. (2015). The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis. *Nature Neuroscience*, 18(6), 794-799.

- Ho, A., Shen, J. (2011). Presenilins in synaptic function and disease. *Trends in Molecular Medicine*, 17(11), 617-624.
- Holcomb, L. A., Gordon, M. N., Jantzen, P., Hsiao, K., Duff, K., Morgan, D. (1999). Behavioral changes in transgenic mice expressing both amyloid precursor protein and presenilin-1 mutations: lack of association with amyloid deposits. *Behavior Genetics*, 29(3), 177-185.
- Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Cole, G. (1996). Correlative memory deficits, A $\beta$  elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science (New York, N.Y.)*, 274(5284), 99-102.
- Huang, H., He, X. (2008). Wnt/beta-catenin signaling: new (and old) players and new insights. *Current Opinion in Cell Biology*, 20(2), 119-125.
- Ichterchenko, K., Hata, Y., Nguyen, T., Ullrich, B., Missler, M., Moomaw, C., Südhof, T. C. (1995). Neuroligin 1: a splice site-specific ligand for beta-neurexins. *Cell*, 81(3), 435-443.
- Ichterchenko, K., Nguyen, T., Südhof, T. C. (1996). Structures, alternative splicing, and neurexin binding of multiple neuroligins. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(5), 2676-2682.
- Imbimbo, B. P., Lombard, J., Pomara, N. (2005). Pathophysiology of Alzheimer's disease. *Neuroimaging Clinics of North America*, 15(4), 727-753, ix.
- Inoue, E., Deguchi-Tawarada, M., Togawa, A., Matsui, C., Arita, K., Katahira-Tayama, S., Takai, Y. (2009). Synaptic activity prompts gamma-secretase-mediated cleavage of EphA4 and dendritic spine formation. *The Journal of Cell Biology*, 185(3), 551-564.
- Irie, M., Hata, Y., Takeuchi, M., Ichterchenko, K., Toyoda, A., Hirao, K., Südhof, T. C. (1997). Binding of neuroligins to PSD-95. *Science (New York, N.Y.)*, 277(5331), 1511-1515.
- Jamain, S., Quach, H., Betancur, C., Råstam, M., Colineaux, C., Gillberg, I. C., Paris Autism Research International Sibpair Study. (2003). Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nature Genetics*, 34(1), 27-29.
- Jankowsky, J. L., Fadale, D. J., Anderson, J., Xu, G. M., Gonzales, V., Jenkins, N. A., Borchelt, D. R. (2004). Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase. *Human Molecular Genetics*, 13(2), 159-170.
- Jung, C. K. E., Fuhrmann, M., Honarnejad, K., Van Leuven, F., Herms, J. (2011). Role of presenilin 1 in structural plasticity of cortical dendritic spines in vivo. *Journal of Neurochemistry*, 119(5), 1064-1073.
- Kawamura, Y., Kikuchi, A., Takada, R., Takada, S., Sudoh, S., Shibamoto, S., Komano, H. (2001). Inhibitory effect of a presenilin 1 mutation on the Wnt signalling pathway by enhancement of  $\beta$ -catenin phosphorylation. *European Journal of Biochemistry*, 268(10), 3036-3041.

- Kim, H.-G., Kishikawa, S., Higgins, A. W., Seong, I.-S., Donovan, D. J., Shen, Y., Gusella, J. F. (2008). Disruption of neurexin 1 associated with autism spectrum disorder. *American Journal of Human Genetics*, 82(1), 199-207.
- Kim, J., Chakrabarty, P., Hanna, A., March, A., Dickson, D. W., Borchelt, D. R., Janus, C. (2013). Normal cognition in transgenic BRI2-A $\beta$  mice. *Molecular Neurodegeneration*, 8, 15.
- Kimberly, W. T., Xia, W., Rahmati, T., Wolfe, M. S., Selkoe, D. J. (2000). The transmembrane aspartates in presenilin 1 and 2 are obligatory for gamma-secretase activity and amyloid beta-protein generation. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(5), 3173-3178.
- Kirschenbaum, F., Hsu, S.-C., Cordell, B., McCarthy, J. V. (2001). Substitution of a Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$  Phosphorylation Site in Presenilin 1 Separates Presenilin Function from  $\beta$ -Catenin Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 276(10), 7366-7375.
- Ko, J., Fuccillo, M. V., Malenka, R. C., Südhof, T. C. (2009). LRRTM2 functions as a neurexin ligand in promoting excitatory synapse formation. *Neuron*, 64(6), 791-798.
- Koehnke, J., Katsamba, P. S., Ahlsen, G., Bahna, F., Vendome, J., Honig, B., Jin, X. (2010). Splice form-dependence of  $\beta$ -neurexin/neuroigin binding interactions. *Neuron*, 67(1), 61-74.
- Krauss, R. S., Cole, F., Gaio, U., Takaesu, G., Zhang, W., Kang, J.-S. (2005). Close encounters: regulation of vertebrate skeletal myogenesis by cell-cell contact. *Journal of Cell Science*, 118(Pt 11), 2355-2362.
- Krueger, D. D., Tuffy, L. P., Papadopoulos, T., Brose, N. (2012). The role of neurexins and neuroligins in the formation, maturation, and function of vertebrate synapses. *Current Opinion in Neurobiology*, 22(3), 412-422.
- Kumar, A., Tsao, J. W. (2018). Alzheimer Disease. StatPearls Publishing.
- Laumonnier, F., Bonnet-Brilhault, F., Gomot, M., Blanc, R., David, A., Moizard, M.-P., Briault, S. (2004). X-linked mental retardation and autism are associated with a mutation in the NLGN4 gene, a member of the neuroligin family. *American Journal of Human Genetics*, 74(3), 552-557.
- Ling, Y., Morgan, K., Kalsheker, N. (2003). Amyloid precursor protein (APP) and the biology of proteolytic processing: relevance to Alzheimer's disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35(11), 1505-1535.
- Lisé, M.-F., El-Husseini, A. (2006). The neuroligin and neurexin families: from structure to function at the synapse. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 63(16), 1833-1849.
- Lopera Restrepo, F. (2012). La enfermedad de Alzheimer Familiar. Recuperado 18 de junio de 2018, a partir de <https://es.scribd.com/document/181555418/06enfermedad-de-Alzheimer-Familiar>
- Louvi, A., Artavanis-Tsakonas, S. (2006). Notch signalling in vertebrate neural development. *Nature Reviews. Neuroscience*, 7(2), 93-102.



Lowther, C., Speevak, M., Armour, C. M., Goh, E. S., Graham, G. E., Li, C., Bassett, A. S. (2017). Molecular characterization of NRXN1 deletions from 19,263 clinical microarray cases identifies exons important for neurodevelopmental disease expression. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 19(1), 53-61.

Maccioni, R. B., Muñoz, J. P., Barbeito, L. (2001). The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Archives of Medical Research*, 32(5), 367-381.

Marambaud, P., Shioi, J., Serban, G., Georgakopoulos, A., Sarnier, S., Nagy, V., Robakis, N. K. (2002). A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. *The EMBO Journal*, 21(8), 1948-1956.

Marambaud, P., Wen, P. H., Dutt, A., Shioi, J., Takashima, A., Siman, R., Robakis, N. K. (2003). A CBP binding transcriptional repressor produced by the PS1/epsilon-cleavage of N-cadherin is inhibited by PS1 FAD mutations. *Cell*, 114(5), 635-645.

Martinez-Mir, A., González-Pérez, A., Gayán, J., Antúnez, C., Marín, J., Boada, M., Real, L. M. (2013). Genetic study of neurexin and neuroligin genes in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 35(2), 403-412.

Mayford, M., Bach, M. E., Huang, Y. Y., Wang, L., Hawkins, R. D., Kandel, E. R. (1996). Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene. *Science (New York, N.Y.)*, 274(5293), 1678-1683.

Meckler, X., Checler, F. (2016). Presenilin 1 and Presenilin 2 Target  $\gamma$ -Secretase Complexes to Distinct Cellular Compartments. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(24), 12821-12837.

Miller, M. T., Mileni, M., Comoletti, D., Stevens, R. C., Harel, M., Taylor, P. (2011). The crystal structure of the  $\alpha$ -neurexin-1 extracellular region reveals a hinge point for mediating synaptic adhesion and function. *Structure (London, England:1993)*, 19(6), 767-778.

Moehlmann, T., Winkler, E., Xia, X., Edbauer, D., Murrell, J., Capell, A., Steiner, H. (2002). Presenilin-1 mutations of leucine 166 equally affect the generation of the Notch and APP intracellular domains independent of their effect on Abeta 42 production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(12), 8025-8030.

Mott, R. T., Hulette, C. M. (2005). Neuropathology of Alzheimer's disease. *Neuroimaging Clinics of North America*, 15(4), 755-765, ix.

Mucke, L., Masliah, E., Yu, G. Q., Mallory, M., Rockenstein, E. M., Tatsuno, G., McConlogue, L. (2000). High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(11), 4050-4058.

Naisbitt, S., Kim, E., Tu, J. C., Xiao, B., Sala, C., Valtschanoff, J., Sheng, M. (1999). Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin. *Neuron*, 23(3), 569-582.

Naito, Y., Tanabe, Y., Lee, A. K., Hamel, E., Takahashi, H. (2017). Amyloid- $\beta$  Oligomers Interact with Neurexin and Diminish Neurexin-mediated Excitatory Presynaptic Organization. *Scientific Reports*, 7, 42548.

Nelson, O., Supnet, C., Liu, H., Bezprozvanny, I. (2010). Familial Alzheimer's disease mutations in presenilins: effects on endoplasmic reticulum calcium homeostasis and correlation with clinical phenotypes. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 21(3), 781-793.

Niessen, C. M., Leckband, D., Yap, A. S. (2011). Tissue organization by cadherin adhesion molecules: dynamic molecular and cellular mechanisms of morphogenetic regulation. *Physiological Reviews*, 91(2), 691-731.

Oh, H. G., Chun, Y. S., Kim, Y., Youn, S. H., Shin, S., Park, M. K., Chung, S. (2012). Modulation of transient receptor potential melastatin related 7 channel by presenilins. *Developmental Neurobiology*, 72(6), 865-877.

Okochi, M., Steiner, H., Fukumori, A., Tanii, H., Tomita, T., Tanaka, T., Haass, C. (2002). Presenilins mediate a dual intramembranous gamma-secretase cleavage of Notch-1. *The EMBO Journal*, 21(20), 5408-5416.

Pack-Chung, E., Meyers, M. B., Pettingell, W. P., Moir, R. D., Brownawell, A. M., Cheng, I., Kim, T. W. (2000). Presenilin 2 interacts with sorcin, a modulator of the ryanodine receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(19), 14440-14445.

Parisiadou, L., Fassa, A., Fotinopoulou, A., Bethani, I., Efthimiopoulos, S. (2004). Presenilin 1 and cadherins: stabilization of cell-cell adhesion and proteolysis-dependent regulation of transcription. *Neuro-Degenerative Diseases*, 1(4-5), 184-191.

Peixoto, R. T., Kunz, P. A., Kwon, H., Mabb, A. M., Sabatini, B. L., Philpot, B. D., Ehlers, M. D. (2012). Transsynaptic signaling by activity-dependent cleavage of neuroligin-1. *Neuron*, 76(2), 396-409.

Poulopoulos, A., Aramuni, G., Meyer, G., Soykan, T., Hoon, M., Papadopoulos, T., Varoqueaux, F. (2009). Neuroligin 2 drives postsynaptic assembly at perisomatic inhibitory synapses through gephyrin and collybistin. *Neuron*, 63(5), 628-642.

Prager, K., Wang-Eckhardt, L., Fluhrer, R., Killick, R., Barth, E., Hampel, H., Walter, J. (2007). A Structural Switch of Presenilin 1 by Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$ -mediated Phosphorylation Regulates the Interaction with  $\beta$ -Catenin and Its Nuclear Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 282(19), 14083-14093.

Qiu, C., Kivipelto, M., von Strauss, E. (2009). Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 11(2), 111-128.

Querfurth, H. W., LaFerla, F. M. (2010). Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine*, 362(4), 329-344.

- Rabaneda, L. G., Robles-Lanuza, E., Nieto-González, J. L., Scholl, F. G. (2014). Neurexin dysfunction in adult neurons results in autistic-like behavior in mice. *Cell Reports*, 8(2), 338-346.
- Reissner, C., Runkel, F., Missler, M. (2013). Neurexins. *Genome Biology*, 14(9), 213.
- Rogers, D. C., Fisher, E. M., Brown, S. D., Peters, J., Hunter, A. J., Martin, J. E. (1997). Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment. *Mammalian Genome: Official Journal of the International Mammalian Genome Society*, 8(10), 711-713.
- Rujescu, D., Ingason, A., Cichon, S., Pietiläinen, O. P. H., Barnes, M. R., Toulopoulou, T., Collier, D. A. (2009). Disruption of the neurexin 1 gene is associated with schizophrenia. *Human Molecular Genetics*, 18(5), 988-996.
- Rybalchenko, V., Hwang, S.-Y., Rybalchenko, N., Koulen, P. (2008). The cytosolic N-terminus of presenilin-1 potentiates mouse ryanodine receptor single channel activity. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40(1), 84-97.
- Ryman, D. C., Acosta-Baena, N., Aisen, P. S., Bird, T., Danek, A., Fox, N. C., Dominantly Inherited Alzheimer Network. (2014). Symptom onset in autosomal dominant Alzheimer disease: a systematic review and meta-analysis. *Neurology*, 83(3), 253-260.
- Saura, C. A., Chen, G., Malkani, S., Choi, S.-Y., Takahashi, R. H., Zhang, D., Shen, J. (2005). Conditional inactivation of presenilin 1 prevents amyloid accumulation and temporarily rescues contextual and spatial working memory impairments in amyloid precursor protein transgenic mice. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(29), 6755-6764.
- Saura, C. A., Choi, S.-Y., Beglopoulos, V., Malkani, S., Zhang, D., Shankaranarayana Rao, B. S., Shen, J. (2004). Loss of presenilin function causes impairments of memory and synaptic plasticity followed by age-dependent neurodegeneration. *Neuron*, 42(1), 23-36.
- Saura, C. A., Servián-Morilla, E., Scholl, F. G. (2011). Presenilin/ $\gamma$ -secretase regulates neurexin processing at synapses. *PLoS One*, 6(4), e19430.
- Scheiffele, P., Fan, J., Choih, J., Fetter, R., Serafini, T. (2000). Neuroligin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons. *Cell*, 101(6), 657-669.
- Schreiner, D., Nguyen, T.-M., Russo, G., Heber, S., Patrignani, A., Ahrné, E., Scheiffele, P. (2014). Targeted combinatorial alternative splicing generates brain region-specific repertoires of neurexins. *Neuron*, 84(2), 386-398.
- Schroeter, E. H., Ilagan, M. X. G., Brunkan, A. L., Hecimovic, S., Li, Y., Xu, M., Kopan, R. (2003). A presenilin dimer at the core of the gamma-secretase enzyme: insights from parallel analysis of Notch 1 and APP proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(22), 13075-13080.

- Selkoe, D. J. (2001). Alzheimer's Disease: Genes, Proteins, and Therapy. *Physiological Reviews*, 81(2), 741-766.
- Serneels, L., Dejaegere, T., Craessaerts, K., Horré, K., Jorissen, E., Tousseyn, T., De Strooper, B. (2005). Differential contribution of the three Aph1 genes to gamma-secretase activity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(5), 1719-1724.
- Servián-Morilla, E., Robles-Lanuza, E., Sánchez-Hidalgo, A. C., Camacho-Garcia, R. J., Paez-Gomez, J. A., Mavillard, F., Scholl, F. G. (2018). Proteolytic Processing of Neurexins by Presenilins Sustains Synaptic Vesicle Release. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 38(4), 901-917.
- Shastry, B. S. (1998). Molecular genetics of familial Alzheimer disease. *The American Journal of the Medical Sciences*, 315(4), 266-272.
- Shen, J., Bronson, R. T., Chen, D. F., Xia, W., Selkoe, D. J., Tonegawa, S. (1997). Skeletal and CNS defects in Presenilin-1-deficient mice. *Cell*, 89(4), 629-639.
- Shen, Jie, Kelleher, R. J. (2007). The presenilin hypothesis of Alzheimer's disease: evidence for a loss-of-function pathogenic mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(2), 403-409.
- Shinozaki, K., Maruyama, K., Kume, H., Tomita, T., Saido, T. C., Iwatsubo, T., Obata, K. (1998). The presenilin 2 loop domain interacts with the mu-calpain C-terminal region. *International Journal of Molecular Medicine*, 1(5), 797-799.
- Sisodia, S. S., St George-Hyslop, P. H. (2002). gamma-Secretase, Notch, Abeta and Alzheimer's disease: where do the presenilins fit in? *Nature Reviews. Neuroscience*, 3(4), 281-290.
- Song, J. Y., Ichtchenko, K., Südhof, T. C., Brose, N. (1999). Neuroligin 1 is a postsynaptic cell-adhesion molecule of excitatory synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(3), 1100-1105.
- Stabler, S. M., Ostrowski, L. L., Janicki, S. M., Monteiro, M. J. (1999). A myristoylated calcium-binding protein that preferentially interacts with the Alzheimer's disease presenilin 2 protein. *The Journal of Cell Biology*, 145(6), 1277-1292.
- Stanga, S., Vrancx, C., Tasiaux, B., Marinangeli, C., Karlström, H., Kienlen-Campard, P. (2018). Specificity of presenilin-1- and presenilin-2-dependent  $\gamma$ -secretases towards substrate processing. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 22(2), 823-833.
- Sterky, F. H., Trotter, J. H., Lee, S.-J., Recktenwald, C. V., Du, X., Zhou, B., Südhof, T. C. (2017). Carbonic anhydrase-related protein CA10 is an evolutionarily conserved pan-neurexin ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(7), E1253-E1262.

- Strassnig, M., Ganguli, M. (2005). About a Peculiar Disease of the Cerebral Cortex. *Psychiatry (Edgmont)*, 2(9), 30-33.
- Struhl, G., Adachi, A. (2000). Requirements for presenilin-dependent cleavage of notch and other transmembrane proteins. *Molecular Cell*, 6(3), 625-636.
- Südhof, T. C. (2008). Neuroligins and neuexins link synaptic function to cognitive disease. *Nature*, 455(7215), 903-911.
- Südhof, T. C. (2017). Synaptic Neuexin Complexes: A Molecular Code for the Logic of Neural Circuits. *Cell*, 171(4), 745-769.
- Sun, L., Zhou, R., Yang, G., Shi, Y. (2017). Analysis of 138 pathogenic mutations in presenilin-1 on the in vitro production of A $\beta$ 42 and A $\beta$ 40 peptides by  $\gamma$ -secretase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(4), E476-E485.
- Suzuki, K., Hayashi, Y., Nakahara, S., Kumazaki, H., Prox, J., Horiuchi, K., Iwatsubo, T. (2012). Activity-dependent proteolytic cleavage of neuroligin-1. *Neuron*, 76(2), 410-422.
- Tabuchi, K., Chen, G., Südhof, T. C., Shen, J. (2009). Conditional forebrain inactivation of nicastrin causes progressive memory impairment and age-related neurodegeneration. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(22), 7290-7301.
- Takami, M., Nagashima, Y., Sano, Y., Ishihara, S., Morishima-Kawashima, M., Funamoto, S., Ihara, Y. (2009). gamma-Secretase: successive tripeptide and tetrapeptide release from the transmembrane domain of beta-carboxyl terminal fragment. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(41), 13042-13052.
- Tandon, A., Fraser, P. (2002). The presenilins. *Genome Biology*, 3(11)
- Terry, R. D., Masliah, E., Salmon, D. P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Katzman, R. (1991). Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Annals of Neurology*, 30(4), 572-580.
- Thinakaran, G., Borchelt, D. R., Lee, M. K., Slunt, H. H., Spitzer, L., Kim, G., Sisodia, S. S. (1996). Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo. *Neuron*, 17(1), 181-190.
- Togashi, H., Abe, K., Mizoguchi, A., Takaoka, K., Chisaka, O., Takeichi, M. (2002). Cadherin regulates dendritic spine morphogenesis. *Neuron*, 35(1), 77-89.
- Treutlein, B., Gokce, O., Quake, S. R., Südhof, T. C. (2014). Cartography of neuexin alternative splicing mapped by single-molecule long-read mRNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(13), E1291-1299.
- Tristán-Clavijo, E., Camacho-Garcia, R. J., Robles-Lanuza, E., Ruiz, A., van der Zee, J., Van Broeckhoven, C., Scholl, F. G. (2015). A truncating mutation in Alzheimer's disease inactivates neuroligin-1 synaptic function. *Neurobiology of Aging*, 36(12), 3171-3175.

- Tu, H., Nelson, O., Bezprozvanny, A., Wang, Z., Lee, S.-F., Hao, Y.-H., Bezprozvanny, I. (2006). Presenilins Form ER Ca<sup>2+</sup> Leak Channels, a Function Disrupted by Familial Alzheimer's Disease-Linked Mutations. *Cell*, 126(5), 981-993.
- Twomey, C., McCarthy, J. V. (2006). Presenilin-1 is an unprimed glycogen synthase kinase-3 $\beta$  substrate. *FEBS Letters*, 580(17), 4015-4020.
- Ullrich, B., Ushkaryov, Y. A., Südhof, T. C. (1995). Cartography of neurexins: more than 1000 isoforms generated by alternative splicing and expressed in distinct subsets of neurons. *Neuron*, 14(3), 497-507.
- Ushkaryov, Y. A., Hata, Y., Ichtchenko, K., Moomaw, C., Afendis, S., Slaughter, C. A., Südhof, T. C. (1994). Conserved domain structure of beta-neurexins. Unusual cleaved signal sequences in receptor-like neuronal cell-surface proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(16), 11987-11992.
- Ushkaryov, Y. A., Petrenko, A. G., Geppert, M., Südhof, T. C. (1992). Neurexins: synaptic cell surface proteins related to the alpha-latrotoxin receptor and laminin. *Science (New York, N.Y.)*, 257(5066), 50-56.
- Ushkaryov, Y. A., Südhof, T. C. (1993). Neurexin III alpha: extensive alternative splicing generates membrane-bound and soluble forms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(14), 6410-6414.
- Ushkaryov, Yuri A., Rohou, A., Sugita, S. (2008). alpha-Latrotoxin and its receptors. *Handbook of Experimental Pharmacology*, (184), 171-206.
- Van Gassen, G., Annaert, W. (2003). Amyloid, presenilins, and Alzheimer's disease. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 9(2), 117-126.
- Varoqueaux, F., Aramuni, G., Rawson, R. L., Mohrmann, R., Missler, M., Gottmann, K., Brose, N. (2006). Neuroligins determine synapse maturation and function. *Neuron*, 51(6), 741-754.
- Varoqueaux, F., Jamain, S., Brose, N. (2004). Neuroligin 2 is exclusively localized to inhibitory synapses. *European Journal of Cell Biology*, 83(9), 449-456.
- Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., Citron, M. (1999). Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science (New York, N.Y.)*, 286(5440), 735-741.
- Vassar, Robert, Kovacs, D. M., Yan, R., Wong, P. C. (2009). The beta-secretase enzyme BACE in health and Alzheimer's disease: regulation, cell biology, function, and therapeutic potential. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(41), 12787-12794.
- Vogel-Ciernia, A., Wood, M. A. (2014). Examining object location and object recognition memory in mice. *Current Protocols in Neuroscience*, 69, 8.31.1-17.

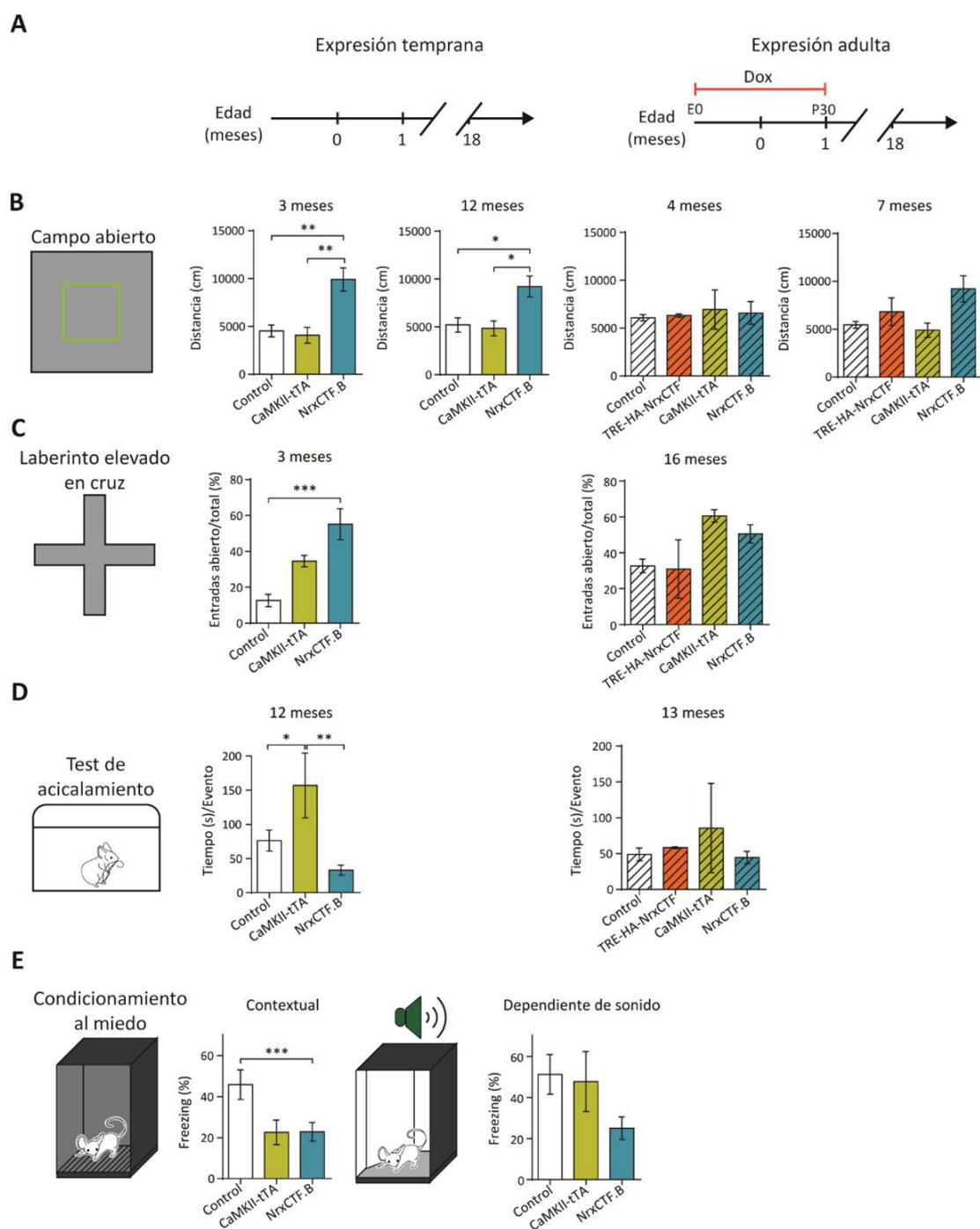
- Weihofen, A., Martoglio, B. (2003). Intramembrane-cleaving proteases: controlled liberation of proteins and bioactive peptides. *Trends in Cell Biology*, 13(2), 71-78.
- Wines-Samuelson, M., Schulte, E. C., Smith, M. J., Aoki, C., Liu, X., Kelleher, R. J., Shen, J. (2010). Characterization of age-dependent and progressive cortical neuronal degeneration in presenilin conditional mutant mice. *PloS One*, 5(4), e10195.
- Wolfe, M. S., Xia, W., Ostaszewski, B. L., Diehl, T. S., Kimberly, W. T., Selkoe, D. J. (1999). Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature*, 398(6727), 513-517.
- Xia, D., Watanabe, H., Wu, B., Lee, S. H., Li, Y., Tsvetkov, E., Kelleher, R. J. (2015). Presenilin-1 knockin mice reveal loss-of-function mechanism for familial Alzheimer's disease. *Neuron*, 85(5), 967-981.
- Zhang, C., Wu, B., Beglopoulos, V., Wines-Samuelson, M., Zhang, D., Dragatsis, I., Shen, J. (2009). Presenilins are essential for regulating neurotransmitter release. *Nature*, 460(7255), 632-636.
- Zhang, H., Liu, J., Sun, S., Pchitskaya, E., Popugaeva, E., Bezprozvanny, I. (2015). Calcium signaling, excitability, and synaptic plasticity defects in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 45(2), 561-580.
- Zhang, H., Sun, S., Herreman, A., Strooper, B. D., Bezprozvanny, I. (2010). Role of Presenilins in Neuronal Calcium Homeostasis. *Journal of Neuroscience*, 30(25), 8566-8580.
- Zhang, S., Zhang, M., Cai, F., Song, W. (2013). Biological function of Presenilin and its role in AD pathogenesis. *Translational Neurodegeneration*, 2(1), 15.
- Zhang, Z., Hartmann, H., Do, V. M., Abramowski, D., Sturchler-Pierrat, C., Staufenbiel, M., Yankner, B. A. (1998). Destabilization of  $\beta$ -catenin by mutations in presenilin-1 potentiates neuronal apoptosis. *Nature*, 395(6703), 698-702.

## VIII. ANEXOS



# 1. Segregación por genotipos en experimentos con resultados relevantes obtenidos en la línea NrxCtf.B

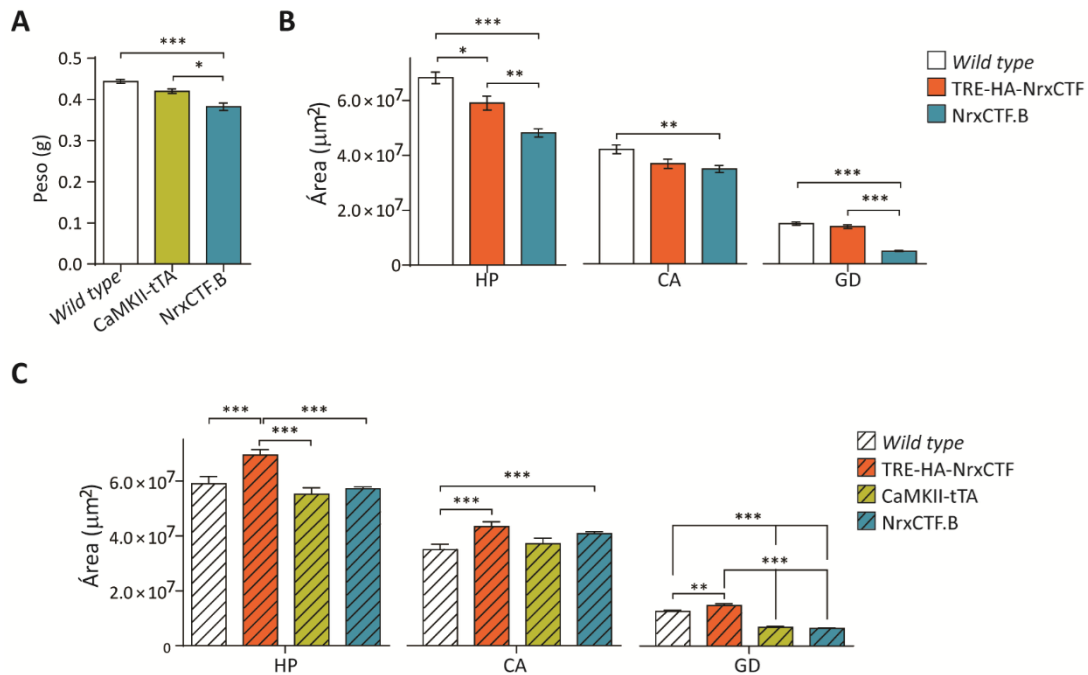
## 1.1. Análisis conductual



**Figura 70.** Tests de comportamiento relevantes realizados a la línea NrxCtf.B con expresión temprana y con expresión adulta. **A**, Esquema gráfico del tratamiento, o no, con Dox. (Continúa pie de figura →)

(← Continúa pie de figura) A la población de expresión adulta se le trató con Dox desde E0 hasta p30. **B**, Test de campo abierto. Distancia total recorrida, Expresión temprana, 3m, *wild type*:  $4527.00 \pm 620.50$ ; CaMKII-tTA:  $4076.00 \pm 825.30$ ; NrxCtf.B:  $9900.00 \pm 1222.00$ ,  $p=0.0008$ . 12m, *wild type*:  $5197.00 \pm 753.30$ ; CaMKII-tTA:  $4839.00 \pm 783.90$ ; NrxCtf.B:  $9214.00 \pm 1088.00$ ,  $p=0.0080$ . Expresión adulta, 4m: *wild type*:  $6083.00 \pm 322.00$ ; TRE-HA-NrxCtf:  $6312.00 \pm 163.70$ ; CaMKII-tTA:  $6935.00 \pm 2058.00$ ; NrxCtf.B:  $6588.00 \pm 1181.00$ ,  $p=0.9727$ . 7m, *wild type*:  $5459.00 \pm 351.50$ ; TRE-HA-NrxCtf:  $6823.00 \pm 1451.00$ ; CaMKII-tTA:  $5954.00 \pm 208.30$ ; NrxCtf.B:  $9652.00 \pm 1958.00$ ,  $p=0.0893$ . Unidades: cm. **C**, Laberinto elevado en cruz. Porcentaje del número de entradas en los brazos abiertos con respecto al total de entradas, Población de expresión temprana, 3 meses, *wild type*:  $12.63 \pm 3.40$ ; CaMKII-tTA:  $34.51 \pm 3.14$ ; NrxCtf.B:  $55.15 \pm 8.66$ ,  $p=0.0007$ . Población de expresión adulta, 13 meses, *wild type*:  $32.70 \pm 3.79$ , TRE-HA-NrxCtf:  $30.99 \pm 16.28$ , CaMKII-tTA:  $60.57 \pm 3.43$ , NrxCtf.B:  $50.59 \pm 5.04$ ,  $p=0.0392$ . Unidades: s. **D**, Test de acicalamiento. Tiempo invertido por evento de acicalamiento, Población de expresión temprana, 12 meses, *wild type*:  $76.25 \pm 15.39$ ; CaMKII-tTA:  $157.00 \pm 47.45$ ; NrxCtf.B:  $33.01 \pm 7.33$ ,  $p=0.0023$ . Población de expresión adulta, 13 meses, *wild type*:  $48.83 \pm 8.86$ , TRE-HA-NrxCtf:  $58.23 \pm 1.45$ , CaMKII-tTA:  $85.56 \pm 62.20$ , NrxCtf.B:  $44.51 \pm 8.49$ ,  $p=0.4370$ . Unidades: s. **E**, Test de condicionamiento al miedo. Fase contextual, *wild type*:  $45.89 \pm 7.18$ ; CaMKII-tTA:  $22.58 \pm 5.98$ ; NrxCtf.B:  $22.90 \pm 4.52$ ,  $p=0.0170$ . Unidades: porcentaje de *freezing* del tiempo total de test. Fase dependiente de sonido, *wild type*:  $51.31 \pm 9.70$ , CaMKII-tTA:  $47.79 \pm 14.63$ , NrxCtf.B:  $25.05 \pm 5.52$ ,  $p=0.0931$ ; unidades: porcentaje de *freezing* del tiempo total de estímulo sonido (90s). A la izquierda y con barras de gráfico lisas, población con expresión temprana (N=8-9 ratones *wild type*, N=4-5 ratones CaMKII-tTA, N=9-10 ratones NrxCtf.B); a la derecha y con barras de gráfico rayadas, población con expresión adulta (N=8 ratones *wild type*, N=2 ratones TRE-HA-NrxCtf, N=2 ratones CaMKII-tTA, N=10 ratones NrxCtf.B). Test estadístico: *one-way* ANOVA con *post-hoc* Bonferroni, *p*-value:  $p^* < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ . Todas las barras de error son SEM.

## 1.2. Neurodegeneración



**Figura 71. Segregación por genotipos en el estudio morfológico de hipocampo mediante la tinción de Nissl.** **A**, Peso del cerebro de ratones de 3 meses de expresión temprana del transgén HA-NrxCtf. N=8 ratones *wild type*, N=3 ratones CaMKII-tTA, N=9 ratones NrxCtf.B. El peso del cerebro de ratones NrxCtf.B está reducido con respecto a ratones *wild type* y CaMKII-tTA (*wild type*: 0.44 ± 0.004; CaMKII-tTA: 0.42 ± 0.005; NrxCtf.B: 0.38 ± 0.009, p<0.0001. Unidades: g). **B**, Cuantificación de hipocampo (HP), *Cornu Ammonis* (CA) y giro dentado (GD) en ratones de la línea NrxCtf.B de 16-18 meses con expresión temprana de HA-NrxCtf. N=2 ratones *wild type*; N=1 ratón TRE-HA-NrxCtf, N=2 ratones NrxCtf.B. Número de cortes cuantificados: *wild type*= 32 cortes, TRE-HA-NrxCtf= 18 cortes, NrxCtf.B= 26 cortes. Hipocampo, *wild type*: 6.83·10<sup>7</sup> ± 0.21·10<sup>7</sup>; TRE-HA-NrxCtf: 5.91·10<sup>7</sup> ± 0.25·10<sup>7</sup>; NrxCtf.B: 4.82·10<sup>7</sup> ± 0.15·10<sup>7</sup>, p<0.0001. CA, *wild type*: 4.18·10<sup>7</sup> ± 0.16·10<sup>7</sup>; TRE-HA-NrxCtf: 3.65·10<sup>7</sup> ± 0.17·10<sup>7</sup>; NrxCtf.B: 3.46·10<sup>7</sup> ± 0.13·10<sup>7</sup>, p=0.0026. GD, *wild type*: 1.47·10<sup>7</sup> ± 0.06·10<sup>7</sup>; TRE-HA-NrxCtf: 1.36·10<sup>7</sup> ± 0.07·10<sup>7</sup>; NrxCtf.B: 0.47·10<sup>7</sup> ± 0.02·10<sup>7</sup>, p<0.0001. Unidades: μm<sup>2</sup>. **C**, Cuantificación de hipocampo (HP), *Cornu Ammonis* (CA) y giro dentado (GD) en ratones de la línea NrxCtf.B de 16-18 meses con expresión adulta de HA-NrxCtf. N=1 ratón *wild type*; N=1 ratón TRE-HA-NrxCtf, N=1 ratón CaMKII-tTA, N=4 ratones NrxCtf.B. Número de cortes cuantificados: *wild type*=20 cortes, TRE-HA-NrxCtf=15 cortes, CaMKII-tTA=12 cortes, NrxCtf.B=70 cortes. Hipocampo, *wild type*: 5.90·10<sup>7</sup> ± 0.25·10<sup>7</sup>; TRE-HA-NrxCtf: 6.95·10<sup>7</sup> ± 0.20·10<sup>7</sup>; CaMKII-tTA: 5.51·10<sup>7</sup> ± 0.24·10<sup>7</sup>; NrxCtf.B: 5.72·10<sup>7</sup> ± 0.07·10<sup>7</sup>; p<0.0001. CA, *wild type*: 3.50·10<sup>7</sup> ± 0.20·10<sup>7</sup>; TRE-HA-NrxCtf: 4.35·10<sup>7</sup> ± 0.17·10<sup>7</sup>; CaMKII-tTA: 3.71·10<sup>7</sup> ± 0.21·10<sup>7</sup>; NrxCtf.B: 4.08·10<sup>7</sup> ± 0.08·10<sup>7</sup>; p=0.0013. GD, *wild type*: 1.27·10<sup>7</sup> ± 0.04·10<sup>7</sup>; TRE-HA-NrxCtf: 1.48·10<sup>7</sup> ± 0.07·10<sup>7</sup>; CaMKII-tTA: 0.69·10<sup>7</sup> ± 0.04·10<sup>7</sup>; (Continúa pie de figura →)

(← Continúa pie de figura)  $NrxCTF.B: 0.64 \cdot 10^7 \pm 0.02 \cdot 10^7$ ,  $p < 0.0001$ . Unidades:  $\mu m^2$ . Test estadístico: *one-way* ANOVA con *post-hoc* Bonferroni, *p*-value:  $p^* < 0.05$ ,  $p^{**} < 0.01$ ,  $p^{***} < 0.001$ . Todas las barras de error son SEM.

## Listado de abreviaturas

**A $\beta$** :  $\beta$ -amiloide

**AD**: Enfermedad de Alzheimer, por sus siglas en inglés *Alzheimer's disease*.

**ADAM**: Familia de las desintegrinas y las metaloproteasas

**AMPA**:  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropionico

**APP**: Proteína precursora de  $\beta$ -amiloide

**APP<sub>sw</sub>**: APP con la mutación sueca

**APP<sub>sw</sub>PS1 $\Delta$ E9**: Ratón transgénico con la mutación de APP sueca y la mutación de *PS1*  
 $\Delta$ E9

**BACE1**:  *$\beta$ -site APP cleaving enzyme 1*

**CA**: *Cornu ammonis*

**CaMKII**: Proteína quinasa dependiente de Calcio y Calmodulina tipo II

**CaMKII-tTA**: Transgén que codifica el transactivador de la transcripción tTA bajo el  
promotor CaMKII

**CASK**: *Calcium/calmodulin dependent serine protein kinase*

**Cblns**: cerebelinas

**CCDV**: Canales de Calcio voltaje dependientes

**CTF**: Fragmento C-terminal

**DAB**: Diaminobencidina

**Dox**: Doxiciclina (antibiótico del grupo de las tetraciclinas)

**DAPT**: N-[N-(3,5-difluorofenacetil-L-alanil)]-S-phenilglicina t-butil éster

**EGF**: Dominios de factor de crecimiento epidermal (del inglés, *epidermal growth factor-like*)

**FAD**: Enfermedad de Alzheimer familiar (del inglés, *Familial Alzheimer disease*)

**FL**: Proteína completa (del inglés, *Full-length*)

**GABA**: Ácido  $\gamma$ -aminobutírico

**GD**: Giro dentado

**GSK3 $\beta$** : Glucógeno sintasa quinasa-3 $\beta$

**GluD2**: Glutamato deshidrogenasa 2

**HA-NrxCTF**: Proteína exógena NrxCTF etiquetada con HA

**HP:** Hipocampo

**ICD:** Dominio intracelular

**InsP3R:** Receptor de inositol trifosfato

**KO:** *Knock-Out*

**KI:** *Knock-In*

**LNS:** Dominio de unión a laminina/neurexina/ globina de unión a hormonas sexuales

**LTP:** Potenciación a largo plazo

**MCP:** Memoria a corto plazo

**MLP:** Memoria a largo plazo

**NMDA:** N-metil-D-aspartato

**Nrxs:** Neurexinas

**NrxCTF.B:** Ratón doble transgénico de la línea B, descendiente de TRE-HA-NrxCTF;  
CaMKII-tTA

**NrxCTF.C:** Ratón doble transgénico de la línea C, descendientes de TRE-HA-NrxCTF;  
CaMKII-tTA

**Nlgn:** Neuroliginas

**NTF:** fragmento N-terminal

**NrxCTF:** CTF de Neurexinas

**PSD95:** Proteína de densidad postsináptica 95

**PS:** Presenilinas

**PS1:** Presenilina 1

**PS2:** Presenilina 2

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**PS cDKO:** Ratón doble *Knock-Out* condicional para Presenilina 1 y *Knock Out* para PS2

**PS1 KI:** Ratón *Knock-In* para presenilina 1

**PIP2:** fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato

**SEM:** Error estándar de la media

**SHIRPA:** Batería de test que evalúan la salud y fenotipo general de los animals de  
experimentación, diseñado por SmithKline Beecham, Harwell, Imperial College  
and Royal London Hospital.

**Slu:** *Stratum lucidum*

**SP:** Péptido señal

**SS:** Sitio de *splicing* alternativo

**SNAP25:** *Synaptosomal-associated protein 25*

**TRE-HA-NrxCTF:** Transgén que codifica para la proteína HA-NrxCTF bajo el promotor TRE  
(elemento de respuesta a tetraciclinas)

**Wild type:** ratón silvestre